

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

VICTOR GUSTAVO BALERA BRITO

PAPEL DOS MASTÓCITOS SOBRE O METABOLISMO
ÓSSEO LOCAL E SISTÊMICO DE RATOS NORMOTENSOS
E HIPERTENSOS COM DOENÇA PERIODONTAL

ARAÇATUBA

2018

VICTOR GUSTAVO BALERA BRITO

**PAPEL DOS MASTÓCITOS SOBRE O METABOLISMO
ÓSSEO LOCAL E SISTÊMICO DE RATOS NORMOTENSOS
E HIPERTENSOS COM DOENÇA PERIODONTAL**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.^a Tit. Sandra Helena Penha de Oliveira

ARAÇATUBA

2018

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B862p Brito, Victor Gustavo Balera.
Papel dos mastócitos sobre o metabolismo ósseo local e sistêmico de ratos normotensos e hipertensos com doença periodontal / Victor Gustavo Balera Brito. - Araçatuba, 2018
139 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira

1. Doenças periodontais 2. Mastócitos 3. Hipertensão
4. Ratos endogâmicos SHR I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

DADOS CURRICULARES

VICTOR GUSTAVO BALERA BRITO

Nascimento: 15 de fevereiro de 1993; Birigüi/SP.

Filiação: Carlos dos Santos Brito
Cássia Rosane Balera Brito

2011/2015: Graduação em Farmácia, Centro Universitário Católico Salesiano *Auxilium* de Araçatuba (UniSalesiano).

2016/2018: Curso de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, nível Mestrado Acadêmico, pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Foa/Unesp).

DEDICATÓRIA

Aos alicerces da minha vida,
meus pais **Carlos** e **Cássia** e avós **Dona Cida** e **Seu Daniel**.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba / Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, nas pessoas de sua direção Professor Titular Wilson Roberto Poi e Professor Titular João Eduardo Gomes Filho, por oferecer a oportunidade de realizar esta pesquisa.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis), nas pessoas de sua coordenação geral, Professora Ilma Brum Silva (UFRGS) e presidente da SBFis, Professor Vagner Roberto Antunes (ICB/USP).

Ao Conselho Local do Programa, na pessoa de sua coordenação, Professora Cristina Antoniali Silva, e demais membros, pelo trabalho e esforços realizados para o crescimento, visibilidade e reconhecimento deste Programa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento desta pesquisa.

À Pró-reitora de pós-graduação da UNESP (PROPG/UNESP), pelo apoio financeiro nas viagens para realização das disciplinas.

Ao Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia (MUBIO) (Convênio FINEP 01.12.0530.00 - PROINFRA 01/2011) da Foa/Unesp, onde foram realizadas as análises de microtomografia, em especial aos seus responsáveis, Professora Sandra Helena Penha de Olivera e Professor Alberto Carlos Botazzo Delbem, e as amigas Melise Jacón Peres Ueno e Fernanda Fernandes, pela ajuda nas análises.

À Seção Técnica de Pós-Graduação desta instituição, e seus servidores técnicos-administrativos, Valéria de Queiroz Marcondes Zagato, Cristiane Regina Lui Matos e Lilian Sayuri Mada, pela eficiência e cordialidade nas ocasiões de necessidade.

A todos os demais funcionários da Foa/Unesp, cujos trabalhos são essenciais para o bom funcionamento desta universidade. Em especial aos senhores Camilo Roberto Venâncio, João Batista Alves Correa e Alan Roger Cenerine Carvalho, responsáveis pelo Biotério Central, pelo trabalho e cordialidade; Aos servidores da Seção de Conservação e Manutenção, por nos salvar nos momentos dos imprevisto; A Seção Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (STAEPE), por todo o suporte solicitado; Aos servidores da limpeza, em especial a Dona Marcia Castellani, por seu trabalho, bom humor e carinho com todos do departamento; e a Dorinha da Cantina, pelo seu trabalho, bom humor e carinho conosco.

Aos professores do Departamento de Ciências Básicas desta instituição, por sua contribuição científica, além do carinho e cuidado não apenas comigo, mas com todos os alunos.

As professoras Cristina Antoniali Silva Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, pela disponibilidade, atenção e valiosas contribuição em meu Exame Geral de Qualificação.

Aos amigos discentes e egressos do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas desta instituição, pela amizade e companheirismo.

A amiga Monique Patricio Singulani, por gentilmente me receber em sua casa em São Paulo, durante o curso das disciplinas no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Aos amigos da FamacoA, Murilo Eduardo Graton, Jéssica Antonini Troiano, Simone Regina Potje e Heitor Ceolin Araujo, pela ótima convivência, deixando os dias de trabalho muito mais agradáveis.

Aos amigos do laboratório, a FarmacoB, pela colaboração e boa vontade diária. Em especial, aos parceiros Carluci Tais Beltran, Ayna Alves Barreto, Sabrina Cruz Tfaile Frasnelli, Dayane Priscilla Queiroz, Letícia Vieira, Mariana Souza Patrocinio, Maria Carolina Linjardi de Souza, que tiveram papel fundamental na realização deste trabalho, além de se mostrarem muito mais do que colegas de trabalhos, verdadeiros amigos! Muitas vezes, passamos mais tempo dentro do laboratório do que com nossas próprias famílias, mas fico muito feliz de que este tempo seja com vocês!

A minha orientadora, Professora Sandra Helena Penha de Oliveira, por ter aberto as portas de seu laboratório em 2012 para um estagiário. Muito obrigado por todos os ensinamentos, broncas, berros e desesperos que nos fez passar! Toda a cobrança e rigidez foi essencial para a minha formação e crescimento científico! Profa Sandra é um dos meus grandes exemplos de trabalho e competência!

EPÍGRAFE

Onde quer que esteja, esteja por inteiro. Se o seu aqui e agora o deixam infeliz, há três opções: abandona-los, mudá-los ou aceitá-los totalmente. Deves escolher uma das opções e aceitar as consequências. Sem desculpas. Sem negatividade.

Adaptado de Eckhart Tölle,
em o Poder do Agora: Um guia para a iluminação espiritual, 1997.

RESUMO

BRITO, V. G. B. **Papel dos mastócitos sobre o metabolismo ósseo local e sistêmico de ratos normotensos e hipertensos com doença periodontal.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

RESUMO

Introdução: A doença periodontal (DP) é uma desordem inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes, iniciada pelo acúmulo de biofilme bacteriano, apresentando consequências locais e sistêmicas. A coexistência de doenças sistêmicas, como a hipertensão, pode levar a uma inflamação exacerbada, maior reabsorção óssea e dano sistêmico pronunciado. Além disso, células imunes residentes têm importante papel na progressão da DP, porém, a participação dos mastócitos (MC) ainda não é bem compreendida. **Objetivos:** Avaliar o papel dos MC sobre o metabolismo ósseo local (mandíbula) e sistêmico (fêmur), em modelo animal normotenso (ratos Wistar) e hipertenso (ratos SHR) com DP. **Métodos:** Ratos machos Wistar e SHR (10 semanas) foram utilizados. A depleção de MC foi conduzida pelo pré-tratamento com o composto 48/80 e a DP foi induzida por ligadura bilateral nos primeiros molares inferiores, mantida por 15 dias. Foi realizada a identificação de MC no tecido gengival, por coloração com Azul de Toluidina. A perda óssea alveolar e parâmetros de arquitetura óssea na mandíbula e fêmur foram avaliados por microtomografia computadorizada, a expressão gênica de marcadores de formação, remodelamento e reabsorção na mandíbula e fêmur foram avaliada por RT-PCR em tempo real, e a produção de citocinas nos tecidos de interesse foi avaliada por ELISA. **Principais resultados:** Observamos significativa perda óssea induzida por DP, principalmente no SHR, em comparação ao Wistar, e a depleção de MC foi capaz de prevenir esta perda. A DP levou a expressão aumentada de *Opn*, *Opg*, *Rankl* e *Rank*, *Trap*, *Ctsk*, *Vtn*, *Itga5* e *Itgb5*, além de aumento na produção de TNF- α , IL-6, IL-10 e CXCL3 na mandíbula, o que foi reduzido em animais depletados de MC. No fêmur, a DP não levou a alterações da arquitetura óssea, mas foi capaz de aumentar a expressão de *Runx2*, *Opn*, *Opg*, *Rankl*, *Rank*, *Trap*, *Mmp2*, *Mmp9*, *Vtn*, *Itga5* e *Itgb5*, o que também foi significativamente reduzido pela depleção de MC. **Conclusões:** Nossos dados sugerem um importante papel dos MC nas consequências ósseas locais (mandíbula) da DP, especialmente nos animais SHR, além dos efeitos sistêmicos (fêmur) onde os MC possivelmente têm participação na modulação da expressão de marcadores ósseo, alterados pela DP, o que foi mediado por vias diferentes das observadas na resposta local.

Palavras chave: Doença periodontal; Mastócitos; Hipertensão; rato SHR.

ABSTRACT

BRITO, V. G. B. **Mast cells role on local and systemic bone metabolism of normotensive and hypertensive rats with periodontal disease.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

ABSTRACT

Introduction: Periodontal disease (PD) is an inflammatory disorder of the tissues supporting the teeth, which start from the bacterial biofilm accumulation, and results in local and systemic damage. The coexistence of systemic diseases, such as hypertension, can lead to exacerbated inflammation, increased alveolar bone resorption and increased systemic damage. In addition, resident immune cells have an important role in PD progression, however the mast cells (MC) participation is still not well understood. **Aims:** To evaluate the role of MC in the local (mandible) and systemic (femur) bone metabolism in a normotensive (Wistar) and hypertensive (SHR) rats with PD. **Methods:** Males Wistar and SHR rats (10-week old) were used. MC depletion was conducted by compound 48/80 treatment and PD was induced by bilateral ligature placed in the lower first molars, which was maintained for 15 days. The identification of MC in the gingival tissue was done by Toluidine Blue staining, alveolar bone loss and bone architecture parameters of mandible and femurs were evaluated by micro-computed tomography, bone markers gene expression on the mandible and femur were evaluated by real time RT-PCR, and the cytokines production was evaluated by ELISA. **Key results:** We observed a more significant PD-induced bone loss in SHR, compared to Wistar, and MC depletion was able to prevent this loss. PD increased the expression of *Opn*, *Opg*/ *Rankl*/*Rank*, *Trap*, *Ctsk*, *Vtn*, *Itga5* and *Itgb5*, as well as increased production of TNF- α , IL-6, IL-10 and CXCL3 in the mandible, what was prevented by MC depleted animals. In the femur, PD did not change bone architecture parameters, but was able to increase expression of *Runx2*, *Opn*, *Opg*/*Rankl*/*Rank*, *Trap*, *Mmp2*, *Mmp9*, *Vtn*, *Itga5* and *Itgb5*, which also was significantly reduced by MC depletion. **Conclusions:** Our data suggest an important role of MC in the local bone consequences (mandible) of PD, especially in SHR, as well the systemic effects (femur), where MC may have a role in bone dynamics by modulating the expression of bone markers, altered by PD, through different mechanism from those observed in the local response.

Key words: Periodontal disease; Mast cells; Hypertension; SHR.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fotomicrografia de citocentrifugação do lavado peritoneal corado com Azul de Toluidina	56
Figura 2 -	Fotos realizadas durante a indução da doença periodontal	57
Figura 3-1 -	Fotomicrografia do tecido gengival, corado com Azul de Toluidina	70
Figura 3-2 -	Fotomicrografia do tecido gengival, corado com Azul de Toluidina	71
Figura 4 -	Análise de microCT do osso alveolar de animais Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos	73
Figura 5 -	Reconstrução tridimensional da mandíbula (região do primeiro molar) de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos	74
Figura 6 -	Expressão gênica das citocinas (A) <i>IL1b</i> , (B) <i>Tnfa</i> e (C) <i>IL6</i> em mandíbula de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos	76
Figura 7 -	Produção das citocinas (A) TNF- α , (B) IL-6, (C) IL-10 e das quimiocinas (D) CXCL3/CINC-2 e (E) CCL20/MIP-3 α em mandíbula de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos	78
Figura 8 -	Expressão gênica dos fatores de transcrição (A) <i>Runx2</i> , (B) <i>Osx</i> e (C) <i>Catnb</i> em mandíbula de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos	80
Figura 9 -	Expressão gênica dos marcadores de formação óssea (A) <i>Alp</i> , (B) <i>Col1a1</i> , (C) <i>Opn</i> , (D) <i>Ocn</i> , (E) <i>Bsp</i> , e (F) <i>Bmp2</i> em mandíbula de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos	82
Figura 10 -	Expressão gênica de marcadores de remodelação óssea (A) <i>Opg</i> , (B) <i>Rankl</i> e (C) <i>Rank</i> em mandíbula de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos	84

Figura 11 -	Expressão gênica dos marcadores de reabsorção óssea (A) <i>Trap</i> , (B) <i>Mmp2</i> , (C) <i>Mmp9</i> , (D) <i>Ctsk</i> , (E) <i>Oscar</i> , (F) <i>Vtn</i> , (G) <i>Itga5</i> , e (H) <i>Itgb5</i> em mandíbula de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos	86
Figura 12 -	Análise de microCT do fêmur distal de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos	88
Figura 13 -	Reconstrução tridimensional da mandíbula (região do primeiro molar) de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos	89
Figura 14 -	Expressão gênica dos fatores de transcrição (A) <i>Runx2</i> , (B) <i>Osx</i> e (C) <i>Catnb</i> no fêmur de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos	92
Figura 15 -	Expressão gênica dos marcadores de formação óssea (A) <i>Alp</i> , (B) <i>Col1a1</i> , (C) <i>Opn</i> , (D) <i>Ocn</i> , (E) <i>Bsp</i> , e (F) <i>Bmp2</i> no fêmur de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos	94
Figura 16 -	Expressão gênica de marcadores de remodelação óssea (A) <i>Opg</i> , (B) <i>Rankl</i> e (C) <i>Rank</i> no fêmur de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos	96
Figura 17 -	Expressão gênica dos marcadores de reabsorção óssea (A) <i>Trap</i> , (B) <i>Mmp2</i> , (C) <i>Mmp9</i> , (D) <i>Ctsk</i> , (E) <i>Oscar</i> , (F) <i>Vtn</i> , (G) <i>Itga5</i> , e (H) <i>Itgb5</i> no fêmur de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos	98
Figura 18 -	Esquema do papel dos mastócitos no metabolismo ósseo local (mandíbula) de animais Wistar com doença periodontal	118
Figura 19 -	Esquema do papel dos mastócitos no metabolismo ósseo local (mandíbula) de animais SHR com doença periodontal	118
Figura 20 -	Esquema do papel dos mastócitos no metabolismo ósseo sistêmico (fêmur) de animais Wistar com doença periodontal	119
Figura 21 -	Esquema do papel dos mastócitos no metabolismo ósseo sistêmico (fêmur) de animais SHR com doença periodontal	119
Figura 22 -	Esquema das conclusões do trabalho	121

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação dos anticorpos utilizados (R&D systems)	61
Tabela 2 -	Relação dos ensaios TaqMan™ utilizados	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μA	- Microampere
μL	- Microlitro
μL	- Microlitro
μm	- Micrometro
Actb	- <i>Beta actin</i>
Alp	- <i>Bone alkaline phosphatase</i>
ANOVA	- <i>Analysis of variance</i> , análise de variância
ASB	- Albumina sérica bovina
Bmp2	- <i>Bone morphogenetic protein 2</i>
Bsp/lbsp	- <i>Bone sialoprotein / Integrin-binding sialoprotein</i>
BV/TV	- <i>Bone volume/Total volume</i> , Volume ósseo/Volume total
c48/80	- Composto 48/80
Catnb	- β-catenin / Cadherin associated protein beta 1
CCL20	- <i>Chemokine (C-C motif) ligand 20</i> , Ligante quimiocina (motivo C-C) 20
cDNA	- <i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> , Ácido desoxirribonucleico complementar
CINC-2	- <i>Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2</i> , Quimiotático de neutrófilo induzido por citocina-2
Co.Po	- Porosidade cortical
Co.Th	- Espessura cortical
Col1a1	- <i>Collagen type I alpha 1</i>
Ct	- <i>Cycle threshold</i> , Ciclo limiar
Ctsk	- <i>Cathepsin K</i>
CXCL2	- <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 2</i> , Ligante quimiocina (motivo C-X-C) 2
DEPC	- <i>Diethyl pyrocarbonate</i> , Pirocarbonato de dietila
DNA	- <i>Deoxyribonucleic acid</i> , Ácido desoxirribonucleico
DNase	- <i>Desoxirribonuclease</i>
DP	- Doença periodontal
HIV	- <i>Human immunodeficiency virus</i> , Vírus da imunodeficiência humana
IL-10	- <i>Interleukin-10</i> , Interleucina-10
IL-6	- <i>Interleukin-6</i> , Interleucina-6
Itgav	- <i>Integrin, alpha V</i>

Itgb5	- <i>Integrin, beta 5</i>
Kg	- Quilograma
kVp	- Pico de quilovoltagem
mg	- Miligrama
microCT	- <i>Micro-computed tomography</i> , micro tomografia computadorizada
MIP-3α	- <i>Macrophage inflammatory protein-3 alpha</i> , Proteína inflamatória de macrófago-3 alfa
mL	- Mililitro
mm	- Milímetro
Mmp2	- <i>Matrix metalloproteinase 2</i>
Mmp9	- <i>Matrix metalloproteinase 9</i>
ms	- Milissegundo
Ocn/Bglap	- <i>Osteocalcin / Bone gamma-carboxyglutamate protein</i>
Opg	- <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b</i>
Opn/Spp1	- <i>Osteopontina / secreted phosphoprotein 1</i>
Oscar	- <i>Osteoclast associated immunoglobulin-like receptor</i>
Osx/Sp7	- <i>Osterix/Sp7 transcription factor</i>
p	- Probabilidade
PBS	- <i>Phosphate-buffered saline</i> , Tampão fosfato salino
qRT-PCR	- <i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i> , Reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
Rank	- <i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11a</i>
Rankl	- <i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11</i>
RCF	- <i>Relative centrifugal force</i> , Força centrífuga relativa
RNA	- <i>Ribonucleic acid</i> , Ácido ribonucleico
RNase	- Ribonuclease
ROI	- <i>Region of interest</i> , Região de interesse
RQ	- <i>Relative quantitation</i> , Quantificação relativa
Runx2	- <i>Runt-related transcription factor 2</i>
S48/80	- Grupo experimental SHR depletado de mastócitos, com doença periodontal
SC	- Grupo experimental SHR controle
SDP	- Grupo experimental SHR com doença periodontal
SEM	- <i>Standard error of the mean</i> , Erro padrão da média
SHR	- <i>Spontaneously hypertensive rat</i> , Rato espontaneamente hipertenso

SMI	- <i>Structure model index</i> , Índice de modelo estrutural
Tb.N	- <i>Trabecular number</i> , Número de trabéculas
Tb.Sp	- <i>Trabecular separation</i> , Separação trabecular
Tb.Th	- <i>Trabecular thickness</i> , Espessura trabecular
TNF-α	- <i>Tumor necrosis factor alpha</i> , Fator de necrose tumoral
Trap/Acp5	- <i>Acid phosphatase 5, tartrate resistant</i>
USP	- <i>United States Pharmacopeia</i>
VOI	- <i>Volume of interest</i> , Volume de interesse
Vtn	- <i>Vitronectin</i>
W48/80	- Grupo experimenta Wistar, depletado de mastócitos, com doença periodontal
WC	- Grupo experimental Wistar controle
WDP	- Grupo experimental Wistar com doença periodontal

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

α	-	Alfa
*	-	Asterisco
β	-	Beta
°	-	Grau
°C	-	Graus Celsius
+	-	Mais
$\pm$	-	Mais ou menos
®	-	Marca registrada
<	-	Menor que
-	-	Menos
:	-	Para (razão matemática)
%	-	Porcentagem / Por cento
TM	-	<i>Trademark</i> ; Marca comercial
Δ	-	Variação
$\Delta\Delta$	-	Variação da variação

LISTA DE ANEXOS

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 -	Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	138
------------------	--	------------

SUMÁRIO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	34
1. INTRODUÇÃO.....	35
1.1. Doença periodontal, aspectos gerais.....	35
1.2. Aspectos sistêmicos da doença periodontal.....	40
1.3. A hipertensão arterial e sua relação com a doença periodontal	41
1.4. Desordens de perda ósseas e sua relação com a doença periodontal e hipertensão arterial.....	43
1.5. Mastócitos e sua relação com a doença periodontal	46
PROPOSIÇÃO	49
2. Proposição.....	50
OBJETIVOS.....	51
3. Objetivos.....	52
3.1 Objetivo geral	52
3.2 Objetivos específicos.....	52
MATERIAL E MÉTODOS	54
4. Material e métodos	55
4.1. Animais e aspectos éticos	55
4.2. Tratamento com o composto 48/80	55
4.3. Indução da doença periodontal	57
4.4. Marcação de mastócitos no tecido gengival	58
4.5. Micro tomografia computadorizada (microCT).....	58
4.5.1. Análise do osso alveolar	58
4.5.2. Análise do porção distal do fêmur.....	59
4.6. Dosagem de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) e quimiocinas (CXCL3/CINC-2 e CCL20/MIP-3 α) na mandíbula e fêmur.....	60
4.6.1. Extração das amostras	60
4.6.2. Ensaio de ELISA sandwich (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	60
4.7. Análise da expressão gênica de marcadores ósseos.....	62
4.7.1. Coleta das amostras	62
4.7.2. Extração e quantificação do RNA total	62
4.7.3 Síntese do DNA complementar e reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	64
4.7.4 Análise dos dados de expressão gênica.....	66
4.8. Análise estatística.....	67
RESULTADOS.....	68
5. Resultados.....	69
5.1. Mastócitos são mais frequentes na gengiva de animais com doença periodontal.....	69

5.2. A depleção de mastócitos previne a perda óssea alveolar induzida pela doença periodontal, principalmente em SHR	72
5.3. A depleção de mastócitos reduz a expressão de citocinas induzida pela doença periodontal em SHR.....	75
5.4. A depleção de mastócitos reduz a produção de mediadores inflamatórios na mandíbula, principalmente SHR	77
5.5. Depleção de mastócitos reduz a expressão de <i>Runx2</i> e <i>Catnb</i> em mandíbulas de SHR com doença periodontal	79
5.6. Depleção de mastócitos previne o aumento da expressão de <i>Opn</i> induzida por doença periodontal em mandíbula	81
5.7. Depleção de mastócitos previne as alterações no eixo Opg/Rankl/Rank induzida por doença periodontal na mandíbula de Wistar e SHR	83
5.8. Depleção prévia de mastócitos previne as alterações em marcadores de reabsorção óssea em mandíbula de Wistar e SHR com doença periodontal.....	85
5.9. Doença periodontal não altera a arquitetura óssea em fêmur de Wistar e SHR	87
5.10. Expressão e produção de citocinas no fêmur	90
5.11. Depleção de mastócitos reduziu a expressão de fatores de transcrição no fêmur de animais com doença periodontal	91
5.12. O aumento da expressão de marcadores de formação óssea no fêmur, induzido pela doença periodontal, tem participação dos mastócitos	93
5.13. O aumento da expressão de Opg/Rankl/Rank no fêmur, induzido pela doença periodontal, tem participação dos mastócitos	95
5.14. O aumento da expressão dos marcadores de reabsorção óssea, induzido pela doença periodontal, tem participação dos mastócitos	97
DISCUSSÃO	99
6. Discussão	100
CONCLUSÃO	120
7. Conclusão.....	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
ANEXOS	137
Anexo 1 - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	138

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença periodontal, aspectos gerais

A doença periodontal é um termo que compreende diversas desordens que afetam o periodonto, ou seja, os tecidos circundantes e de suporte do dente (Pihlstrom, Michalowicz et al. 2005, Kinane, Stathopoulou et al. 2017). O periodonto exerce a função primária de ancorar os dentes no alvéolo dentário, com uma organização anatômica e funcional complexa. Basicamente, compreende quatro estruturas: a) *Gengiva* (Tecido conjuntivo mole que recobre o osso alveolar e a raiz dos dentes até a porção cervical, na junção cimento-esmalte, podendo ser anatomicamente dividida em gengiva marginal, aderida e interdental, tem função primária de resistir a danos mecânicos e ataque microbiológico, protegendo os tecidos internos) (Cho and Garant 2000); b) *Ligamento periodontal* (Intimamente ligado ao tecido gengival e processo alveolar, mediando a ancoragem dos dentes, além de importante papel na manutenção e adaptabilidade do periodonto) (Newman, Takei et al. 2006); c) *Cemento* (Tecido conectivo mineralizado e não vascularizado que cobre a superfície radicular dos dentes, formando uma interface entre a dentina e o ligamento periodontal, onde este se insere) (Cho and Garant 2000); e d) *Osso alveolar* (Processo alveolar dos ossos da mandíbula e maxila, na qual os dentes estão inseridos, abrigam as raízes dos dentes e recebem e distribuem as pressões oclusais, tratando-se de uma estrutura bastante ativa e grande capacidade de remodelamento) (Cho and Garant 2000, Huja, Fernandez et al. 2006).

Assim, tais condições podem ter diversas etiologias e fatores de risco, entretanto a forma mais comum e estudada é a doença periodontal resultante do biofilme bacteriano ou placa dentária adjacente aos dentes, acumulada diariamente, devido a higienização incorreta (Pihlstrom, Michalowicz et al. 2005).

Ainda assim, outras naturezas etiológicas podem ser elencadas: a) *Desordens genéticas com manifestação periodontal*, como síndrome de *Haim-Munk* e *Papillon-Lefèvre* (mutação no gene da catepsina K, leva a destruição periodontal prematura) (Rai, Thiagarajan et al. 2010), síndrome *Chédiak-Higashi* (mutação no gene regulador de tráfico lisossomal, leva a disfunção fagocítica, predispondo a infecções frequentes) (Bailleul-Forestier, Monod-Broca et al. 2008), síndrome *Ehlers-Danlos* tipo 4 e 8 (mutação em diversos genes que compromete a estrutura do tecido conjuntivo e a resposta imunológica) (Kapferer-Seebacher, Pepin et al. 2016), síndrome de *Kindlers* (desordem dermatológica com manifestações periodontais, causada por mutação no gene da proteína kindlin-1) (Wiebe, Petricca et al. 2008), e síndrome de *Cohen* (alteração no cromossomo 8, leva a atrasos no desenvolvimento neurogênico e obesidade, sendo isto associado a prejuízos periodontais precoces (Alaluusua, Kivitie-Kallio et al. 1997); b) *Síndromes metabólicas*, como diabetes em indivíduos com mau controle glicêmico que aumentam significativamente o risco para o desenvolvimento e progressão da doença periodontal (Preshaw, Alba et al. 2012); c) *Osteoporose*, síndrome osteometabólica que leva a prejuízos ósseos generalizados, e pode ser apontada como fator de risco para a doença periodontal (Wang and McCauley 2016); d) *Hábitos deletérios*, como o tabagismo e etilismo, que contribuem para o desenvolvimento e severidade da doença periodontal, por serem potencialmente agressivos aos tecidos

periodontais (Tezal, Grossi et al. 2001, Bergstrom 2004); e) *Deficiências imunológicas*, de origem genética ou adquirida, como na infecção por HIV, que levam a uma resposta imune prejudicada, favorecendo a colonização bacteriana e a progressão da doença periodontal (Al-Hezaimi, Javed et al. 2012), e f) *Outros fatores*, como nutrição, trauma e neoplasias também podem ser associados a condições periodontais, mas com menor incidência (Newman, Takei et al. 2014).

Devido alta prevalência, a doença periodontal é considerada um problema de saúde pública bastante significativo, e segundo dados do *Global Burden of Diseases Study*, a prevalência global da doença em 2016 foi de 10.54% (aproximadamente 750 milhões de pessoas), e no Brasil, 11.9% (aproximadamente 24 milhões de pessoas), considerando ambos sexos e todas as idades, sendo observada maior prevalência em indivíduos adultos a partir de 35 anos (16.5%) e acima de 45 anos (45%) (Richards 2014, DALYs and Collaborators 2016). Como pontuado por Chapple (2014), trata-se de uma das doenças inflamatórias crônicas mais comuns, especialmente na população socioeconomicamente desfavorecida, sem acesso a informações e atendimento médico-odontológico adequado, sendo a principal causa de perda dentária, favorecendo disfunções mastigatórias, comprometimento de fala e prejuízos na qualidade de vida (Bonfim Mde, Mattos et al. 2013, Batchelor 2014).

A patogênese da doença periodontal, de maneira geral, apresenta as fases comuns da demais desordens inflamatórias crônicas. Inicialmente, o acúmulo de biofilme dental gera uma resposta local, o que posteriormente se agrava levando a um quadro de gengivite com sinais clínicos já pronunciados, mas ainda reversíveis, visto que nesta fase a remoção do biofilme dental, cessa o estímulo inflamatório levando a resolução espontânea (Hasan and Palmer 2014, Lindhe,

Lang et al. 2015). Por outro lado, a permanência do biofilme dental leva a cronificação do processo inflamatório infeccioso, e eventualmente, o agravamento da condição resulta na formação de bolsas periodontais, caracterizadas pelo aprofundamento do sulco gengival, criando um compartimento colonizado por microrganismos (Pihlstrom, Michalowicz et al. 2005, Newman, Takei et al. 2014)

Neste ponto, a doença pode levar a consequências irreversíveis à saúde periodontal, principalmente pela progressão mais acelerada, visto que a higienização oral convencional não é mais suficiente para eliminar o foco infeccioso, exigindo atenção odontológica especializada (Plessas 2014, Teughels, Dhondt et al. 2014). O tratamento adequado pode resolver a contaminação e inflamação, assim como levar a regeneração parcial dos tecidos epiteliais e conjuntivos, incluindo o ósseo, entretanto a completa restauração das estruturas periodontais não ocorre. Sem o tratamento, o avanço patológico poderá levar a perda do elemento dentário pela deterioração periodontal progressiva, cuja inclusive pode dificultar ou comprometer uma reabilitação protética posterior (Berglundh, Persson et al. 2002, Schou, Holmstrup et al. 2006, Donos, Laurell et al. 2012).

Apesar do fator determinante para o desenvolvimento da doença periodontal ser o microbiológico, a progressão da doença também depende da susceptibilidade do hospedeiro, configurando uma interação dinâmica patógeno-hospedeiro. A resposta frente ao desafio microbiológico é essencialmente protetora, porém a hiper-responsividade ou hiporresponsividade de vias imunes específicas podem contribuir significativamente para a destruição tecidual. Por exemplo, a atividade de células imunes fagocíticas é bastante importante na contenção do avanço microbiológico, de modo que a subatividade ou a

hiperatividade destas células podem causar prejuízos a saúde periodontal (Preshaw, Seymour et al. 2004). Ainda deve-se considerar o recrutamento crônico de células imunes, característica da resposta inflamatória periodontal, devido a permanência do estímulo microbiano. Tanto as células do hospedeiro quanto os microrganismo produzem enzimas proteolíticas que mediam a desorganização e destruição dos tecidos periodontais (Scott and Krauss 2012).

Ademais, células imunes residentes e recrutadas e células não imunes produzem grande quantidade de mediadores inflamatórios de diferentes naturezas, como eicosanoides, vasoativos, quimiocinas (quimiotáticos) e citocinas (sinalizadores pleiotrópicos), que orquestram a transição de uma resposta imune predominantemente inata, para uma resposta inata/adaptativas, na fase crônica, com componentes de resposta celulares (principalmente T_H1 , no início da fase crônica, e T_H2 e T_H17 , fases mais tardias) e humoral (células B). Assim, a resposta imune inflamatória torna-se cada vez mais robusta, menos autolimitada e incapaz de reestabelecer a homeostasia periodontal (Cekici, Kantarci et al. 2014).

Atualmente, nenhum fator do hospedeiro é especificamente identificado como a razão da progressão patológica, mas é bem estabelecido que a resposta inflamatória, inicialmente protetora, quando crônicas, frente ao constante desafio microbiológico, é significativamente responsável pelo dano periodontal progressivo (Cekici, Kantarci et al. 2014, Kulkarni and Kinane 2014).

1.2. Aspectos sistêmicos da doença periodontal

Atualmente, entende-se por “medicina periodontal” como o campo dedicado ao estudo da saúde periodontal associada a saúde geral do indivíduo, cujo objetivo é evidenciar possíveis correlações que apresentem mecanismos de causalidade (Williams and Offenbacher 2000). Apesar da percepção e interesse da comunidade científica pela relação entre a saúde oral e sistêmica existir desde o início do século XX (Hunter 1900, Hunter 1911, Newman 1996), apenas trabalhos científicos surgidos nas últimas décadas apresentando maior rigor científicos associado a métodos mais modernos permitiram, de fato, estabelecer relações de causalidade e propor mecanismos biológicos plausíveis para as observações no âmbito da medicina periodontal (Winning and Linden 2017).

Dessa forma, recentemente tem crescido o número de trabalhos que relacionam a doença periodontal com condições sistêmicas, sendo alguns capazes de estabelecer uma relação bidirecional (Kim and Amar 2006), principalmente doenças cardiovasculares arterioscleróticas (Yamazaki, Honda et al. 2007, Tonetti, Van Dyke et al. 2013), síndromes metabólicas, como diabetes (Taylor 2001, Chapple, Genco et al. 2013), complicações gestacionais (Sanz, Kornman et al. 2013), e osteoporose (Svedha, Mahendra et al. 2017). Além disso, outras condições também já foram relacionadas a doença periodontal, como artrite reumatoide, obesidade, doenças respiratórias, disfunções renais, e câncer (Linden, Herzberg et al. 2013, Koziel, Mydel et al. 2014, Olsen 2015).

Mecanismos patológicos já foram propostos para explicar tais relações, sendo principalmente:

a) *Mecanismo direto*: A progressão da doença com a formação de bolsas periodontais eventualmente leva a ulcerações do epitélio de revestimento e

desorganização do tecido conjuntivo adjacente, favorecendo o acesso de patógenos, ou componentes e subprodutos microbiológicos patogênicos, à circulação sistêmica; como já evidenciado pela identificação de bactérias periodontais em trombos no miocárdio infartado (Ohki, Itabashi et al. 2012); e

b) Mecanismo indireto: Atualmente já é bem estabelecido que a inflamação trata-se de um denominador comum para diversas doenças sistêmicas crônicas, como complicações cardiovasculares, diabetes e obesidade, deste modo, a doença periodontal trata-se de uma fonte crônica para um processo inflamatório sistêmico de baixa intensidade (*low-grade systemic inflammation*), como já evidenciado por trabalhos mostrando principalmente o aumento dos níveis de proteína C reativa circulantes como um marcador (Paraskevas, Huizinga et al. 2008).

Apesar de ainda serem necessário mais estudos no âmbito epidemiológico, clínico e básico, para melhor compreender as respostas biológicas, as evidências reunidas até o momento já são suficientes para que a doença periodontal seja vista não mais apenas como uma condição oral, mas como uma doença de impacto sistêmico.

1.3. A hipertensão arterial e sua relação com a doença periodontal

A hipertensão arterial é uma doença crônica caracteriza pela elevação da pressão arterial, e basicamente, pode ser classificada como secundária, quando apresenta uma causa definida, sendo as mais comuns desordens hormonais e disfunções renais, enquanto a hipertensão primária, também chamada essencial ou idiopática, não apresenta causa inicial definida, mas é associada

principalmente a fatores genéticos (hereditariedade) e hábitos de vida (sedentarismo, dieta desregrada, estresse entre outros), correspondendo a cerca de 90% dos diagnósticos de hipertensão (Carretero and Oparil 2000, Poulter, Prabhakaran et al. 2015). Estima-se por estudos sistemáticos que cerca de 30% da população mundial seja hipertensa, com maior prevalência na população mais velha, e em países emergentes (Mills, Bundy et al. 2016). Epidemiologicamente, é bastante associada a níveis de mortalidade e comorbidades, alarmando diversas entidades de saúde pública (Whitworth and World Health Organization 2003, Malachias, Souza et al. 2016).

Desse modo, é bem alta a probabilidade de coexistência da hipertensão a outras condições, sendo uma delas a doença periodontal, neste caso, principalmente por compartilharem vários fatores de risco, como revisado por Lockhart, Bolger et al. (2012). Ambas condições intuitivamente não parecem ter relação direta, entretanto evidências têm permitido estabelecer estas associações, como por exemplo, o processo inflamatório sistêmico crônico, que vem sendo discutido como o principal mecanismo comum entre as duas condições (Boos and Lip 2006, Harrison, Guzik et al. 2011, Caillon and Schiffrin 2016).

A relevância do componente inflamatório no estabelecimento da hipertensão arterial tem sido amplamente estudado nos últimos anos, como revisado por muitos autores (Savoia and Schiffrin 2006, Harrison, Guzik et al. 2011, Harrison, Marvar et al. 2012). Como sugerido por Caillon and Schiffrin (2016), a hipertensão aparenta apresentar um “ciclo vicioso inflamatório”, onde elementos patofisiológicos, como por exemplo o *shear stress* e alterações do sistema renina-angiotensina, levam a processos inflamatórios que por sua vez

agravam as condição hipertensiva. Diversos trabalhos já mostraram a relação da doença com a produção aumentada de citocinas (Mirhafez, Mohebati et al. 2014), estresse oxidativo (Brock, Butterworth et al. 2004, Bullon, Cordero et al. 2011), e disfunções endoteliais (Higashi, Goto et al. 2009, Brito, DalBo et al. 2013).

Processos imunológicos têm se mostrado mais relevantes e chamado mais atenção, não apenas na hipertensão, mas em diversas doenças sistêmicas. Como revisado por Harrison, Guzik et al. (2011) pontua diversos mecanismos imunológicos possivelmente relacionados a hipertensão, alguns com potencial terapêutico, permitindo assim entender melhor as relações da doença periodontal e a hipertensão, assim como visar novos avanços terapêuticos.

Apesar de não haver um consenso sobre relações de causalidade entre a hipertensão e a doença periodontal, baseado nas diversas evidências apresentadas, várias autores defendem esta hipótese (Leong, Ng et al. 2014, Macedo Paizan and Vilela-Martin 2014).

1.4. Desordens de perda ósseas e sua relação com a doença periodontal e hipertensão arterial

Assim como os demais sistemas orgânicos, os ossos são suscetíveis a desordens homeostáticas e processo patológicos de diferentes naturezas que podem levar a perda óssea progressiva, possivelmente resultando em dores, limitação de movimentos, maior risco de fraturas, entre outros prejuízos para qualidade de vida (Feng and McDonald 2011).

A osteopenia e osteoporose estão entre as desordens ósseas de maior prevalência, sendo caracterizadas pela redução da massa óssea e deterioração da arquitetura tecidual, aumentando a fragilidade e o risco de fraturas (Nih Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention and Therapy 2001). O processo patogênico se estabelece a partir de déficits nos ciclos de remodelamento ósseo, onde a reabsorção é maior que o de formação óssea, havendo alterações na densidade mineral óssea e microarquitetura normal do tecido.

Tratando-se de um distúrbio osteometabólico multifatorial, diferentes variáveis afetam o estabelecimento patológico, entre os principais contribuintes estão a idade (Beausejour 2007, Kassem and Marie 2011), herança genética (Li, Chen et al. 2004), influência hormonal (Vanderschueren, Vandenput et al. 2004, Weitzmann and Pacifici 2006), alterações nutricionais (Cashman 2007), atividade física (Forwood and Burr 1993, Langsetmo, Hitchcock et al. 2012) e alterações no microambiente ósseo, como aumento de espécies reativas de oxigênio e mediadores inflamatórios circulantes.

Nos últimos anos muitos estudos têm demonstrado os mecanismos relacionados às desordens ósseas induzidas por mediadores inflamatórios (Ginaldi, Di Benedetto et al. 2005, Mundy 2007), bem como a associação entre doenças inflamatórias sistêmicas e perda óssea, incluindo a doença periodontal e hipertensão (Hardy and Cooper 2009, Barbato, Francioni et al. 2015).

A hipertensão é um fator de risco para as desordens de perda óssea (Rodan and Martin 2000, Woo, Kwok et al. 2009). Estudos epidemiológicos e em animais têm demonstrado que a alta pressão sanguínea está associada ao metabolismo anormal de cálcio, incluindo o aumento na excreção urinária de

cálcio, níveis elevados de hormônio da paratireoide e uma tendência de níveis reduzidos de cálcio ionizado no soro (Cappuccio, Kalaitzidis et al. 2000). Esta perda de cálcio poderia levar ao aumento do movimento do íon a partir do osso e assim, o aumento do risco para osteoporose. As estratégias usadas para o manejo da osteoporose incluem moduladores seletivos de estrógenos, terapia de reposição hormonal, calcitonina e bisfosfonatos (Rodan and Martin 2000). Embora estes protocolos terapêuticos estejam disponíveis e sejam amplamente utilizados clinicamente, apresentam limitações terapêuticas, talvez em partes por não apresentarem nenhum efeito sobre os componentes inflamatórios.

Um modelo experimental muito utilizado, que inclui desordens ósseas e hipertensão arterial são os SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*; Ratos espontaneamente hipertensos). Desenvolvidos como um modelo genético de hipertensão arterial, são bastante similares em muitos aspectos à hipertensão arterial essencial humana (Okamoto and Aoki 1963, Yamori 1994). Estes animais nascem normotensos com pressão arterial média de 110 mmHg e desenvolvem espontaneamente aumento de pressão arterial a partir da 6ª semana de vida, podendo alcançar valores próximo a 200 mmHg aos 12 meses de idade, além de apresentarem alterações ósseas intrínsecas (Landim de Barros, Brito et al. 2016).

Diferentes estudos clínicos e experimentais têm mostrado que a hipertensão prejudica a qualidade e densidade de tecidos ósseos (Afghani and Johnson 2006, Afghani and Goran 2007). Entre eles, muitos têm mostrado que ratos SHR apresentam alterações importantes no metabolismo ósseo, como aumento no *turnover* ósseo e redução na massa óssea cortical e trabecular (Inoue, Moriya et al. 1995, Bastos, Brilhante et al. 2010, Manrique, Pereira et al.

2012). Dessa forma, investigar os mecanismos envolvidos no metabolismo óssea em ratos SHR com doença periodontal poderá ser uma ferramenta importante para entender as causas de uma maior perda óssea nestes animais, o que pode levar a inovações terapêuticas.

1.5. Mastócitos e sua relação com a hipertensão e a doença periodontal

Os mastócitos são células residentes do tecido conjuntivo, originados de células hematopoiéticas pluripotentes da medula óssea. São células relativamente grandes e morfologicamente variam de acordo com a sua localização, com aparência fusiforme, poligonal ou oval (Rao and Brown 2008). Comumente encontrados nos tecidos subcutâneos e nas mucosas, próximos a vasos sanguíneos e nervos. Apresentam núcleos basófilos, levemente excêntricos, com à presença de um ou mais nucléolos. Caracterizados por apresentar diferentes grânulos metacromáticos, em grande quantidade no citoplasma, ricos em mediadores químicos, secretados pelo processo de degranulação (da Silva, Jamur et al. 2014).

Os mastócitos desempenham um papel fundamental na resposta inflamatória, no reparo tecidual e na defesa do organismo, envolvidos na resposta imune inata e adquirida, produzindo mediadores que atuam na resposta celular tipo Th1 e Th2. Quando entram em contato com produtos bacterianos, são imediatamente ativadas, liberando grande quantidade mediadores pró-inflamatórios, como histamina, leucotrienos, fator ativador de plaquetas, fator de necrose tumoral, interleucinas e quimiocinas. Em relação ao reparo tecidual, atuam induzindo a produção de metaloproteinases de matriz, além disso, são

capazes de fagocitar, processar e fazer apresentação de antígenos (Walsh 2003, Krystel-Whittemore, Dileepan et al. 2015).

Ademais, os mastócitos têm mostrado uma relação direta com doenças cardíacas hipertensivas (Shiota, Rysa et al. 2003, Zhang and Shi 2012), corroborando com as evidências apresentadas anteriormente a respeito de processos imunológicos mais pronunciados relacionados a hipertensão. Também deve ser pontuado que além do sistema renina-angiotensina tradicional, já extensivamente estudado, têm surgido evidências de sistemas renina-angiotensina locais, em diversos tecidos, incluindo o periodonto, com funções fisiopatológicas não cardiovasculares, como inflamação e reparo tecidual (Paul, Poyan Mehr et al. 2006, Santos, Morandini et al. 2015). Sendo os mastócitos a única fonte de renina extra-renal até então conhecida (Silver, Reid et al. 2004), possivelmente são capazes de modular esses sistemas, e por consequências as respostas teciduais frente a desordens.

Na doença periodontal, a destruição do periodonto pode estar relacionada com as populações de mastócitos residentes e migrantes durante a resposta imunológica inflamatória. Carranza and Cabrini (1955) foram os primeiros a pesquisarem a presença de mastócitos na doença periodontal em humanos, observando-os em grande número nos tecidos periodontais inflamados. Desde então, muitos trabalhos relataram o aumento significativo de mastócitos em pacientes com gengivite e periodontite crônica, reforçando a hipótese de que estas células podem promover a destruição tecidual (Frame and Nixon 1968, Barnett 1974, Naesse, Schreurs et al. 2003, Batista, Rodini et al. 2005). Assim, supõe-se que os mastócitos possam ter um importante papel na resposta

inflamatória periodontal, no entanto, os mecanismos pelos quais estas células contribuir para o prejuízo ósseo são pouco conhecidos.

Embora exista um vasto conhecimento científico a respeito da patogênese da doença periodontal e seus efeitos sistêmicos, o presente trabalho visa investigar o papel dos mastócitos sobre o metabolismo ósseo local e sistêmico de ratos normotensos e hipertensos com doença periodontal.

PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

A grande prevalência da hipertensão e da doença periodontal, além da possível coexistência destas patologias, devido fatores de riscos comuns, fazem desta situação um relevante problema de saúde pública. Assim, cada vez mais estudos são direcionados para a melhor compreensão dos mecanismos patogênicos e descoberta de novos alvos terapêuticos, no objetivo de ampliar as alternativas de tratamentos, bem como otimizar as terapias já estabelecidas, para assim melhorar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos.

A participação dos mastócitos na doença periodontal ainda é pouco compreendida, e quando associada a hipertensão, podem haver possíveis diferenças na resposta destas células, provavelmente marcada por uma resposta inflamatória exacerbada, favorecendo a destruição periodontal, bem como os efeitos sistêmicos da doença. Os animais SHR apresentam alterações genéticas que resultam no estabelecimento da hipertensão arterial, além de apresentarem alterações no metabolismo ósseo e na resposta imune, caracterizando um modelo interessante para os objetivos deste trabalho.

Considerando as informações acima expostas, justificamos as investigações propostas no presente trabalho, que analisará o papel dos mastócitos sobre o metabolismo ósseo local (mandíbula) e sistêmicos (fêmur) em modelo animal normotenso e hipertenso com doença periodontal experimentalmente induzida, sob a hipótese de que estas células tenham importante papel na severidade e consequências sistêmicas da doença.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel dos mastócitos sobre o metabolismo ósseo local e sistêmico de animais Wistar (normotenso) e SHR (espontaneamente hipertenso) com doença periodontal.

3.2 Objetivos específicos

Para responder a proposição e cumprir nosso objetivo geral, foram propostas as seguintes estratégias:

- a) Prévia depleção de mastócitos com agente farmacológico (composto 48/80);
- b) Estabelecer a doença periodontal por 15 dias no modelo animal proposto, por ligadura bilateral nos primeiros molares inferiores;
- c) Identificar a presença de mastócitos no tecido gengival, no modelo proposto;
- d) Avaliar as consequências na arquitetura óssea local (osso alveolar) e sistêmica (fêmur) da doença periodontal no modelo proposto, por microtomografia computadorizada;
- e) Avaliar qualitativamente o tecido ósseo na mandíbula e fêmur no modelo proposto, pela expressão gênica de formação óssea (*Runx2*, *Osterix*, β -*catenina*, *osteoprotegerina*, *proteína morfogenética óssea-2*, *fosfatase alcalina específica do osso*; *osteocalcina*, *osteopontina* e *sialoproteína óssea*), reabsorção/remodelamento ósseo (*fosfatase ácida resistente ao tartarato*, *Rank*, *Rankl*, *cathepsina K*, *metaloproteinases da matriz 2 e 9*, *vitronectina*, *integrinas* e *molécula co-assessória OSCAR*);

f) Avaliar a expressão e produção de mediadores inflamatórios na mandíbula e fêmur, no modelo proposto, pelo ensaio de RT-PCR em tempo real e ELISA, respectivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e aspectos éticos

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*), sendo 40 animais da linhagem Wistar e 40 animais da linhagem SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*), adultos (10 semanas), oriundos do Biotério do Departamento de Ciências Básicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp. Os animais Wistar e SHR foram mantidos em salas separadas, com umidade e temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro (12/12 horas), 3-4 animais por caixa plástica forradas com maravalha, consumindo o mesmo tipo de ração (Labina, Nestlé, Brasil) e água potável *ad libitum*. Foram tomadas todas as medidas necessárias para utilizar o menor número possível de animais e evitar seu sofrimento. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão Local de Ética para Experimentação Animal (Protocolo CEUA/FOA nº 00686-2016), cujo certificado encontra-se no Anexo I.

4.2. Tratamento com o composto 48/80

Para avaliar o papel dos mastócitos no modelo experimental proposto os animais foram previamente depletados de mastócitos, a partir do tratamento com o composto 48/80 (Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri, USA) (c48/80; agente farmacológico indutor da degranulação de mastócitos). O c48/80 foi administrado via intraperitoneal, por 4 dias de 12/12 horas, em doses crescentes (1º e 2º dia: 0,6 mg/kg, 3º dia: 1,2 mg/kg; e 4º dia: 2,4 mg/kg), para que no 5º dia fosse realizada a indução da doença periodontal. Para comprovar a depleção sistêmica dos mastócitos, foi coletado o lavado peritoneal, e lâminas foram

confeccionadas por citocentrifugação e coloradas com Azul de Toluidina, para identificação das células. Imagens representativas são mostradas na Figura 1.

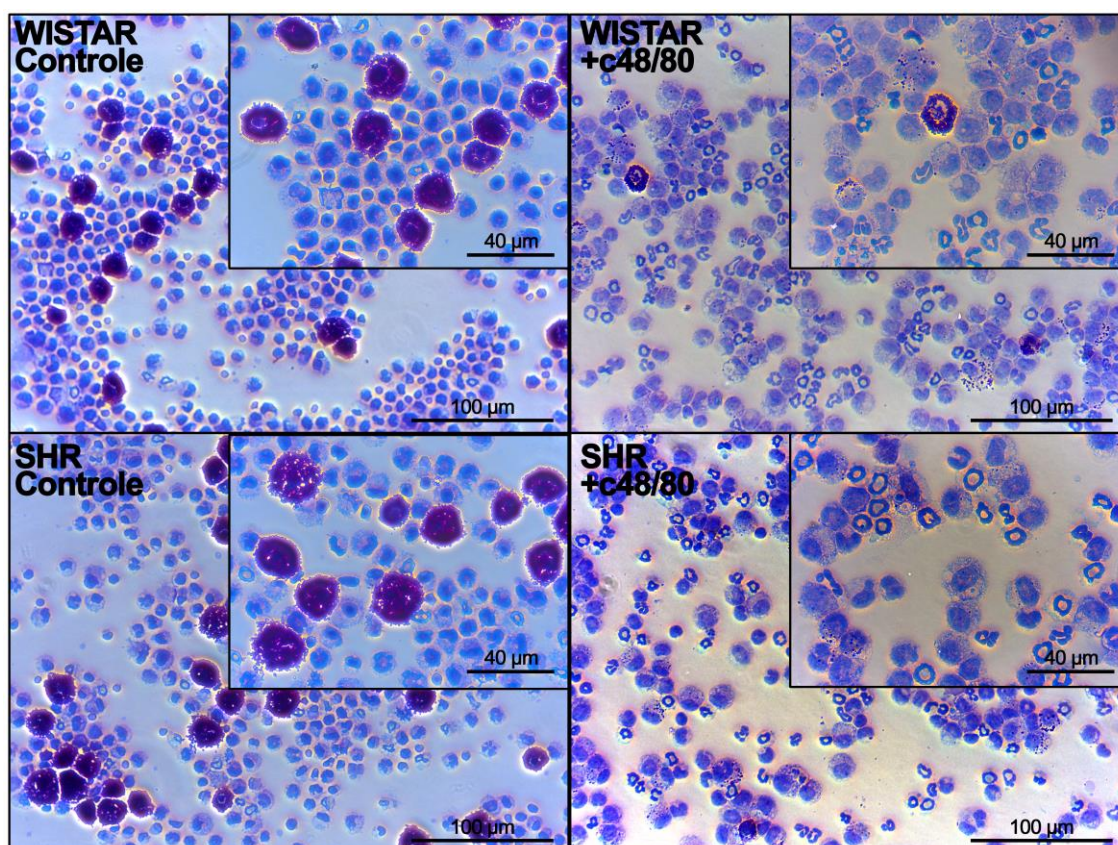


Figura 1 - Fotomicrografia de citocentrifugação do lavado peritoneal corado com Azul de Toluidina. Mastócitos observados colorados em roxo intenso. As imagens são representativas dos grupos.

4.3. Indução da doença periodontal

O procedimento para indução da doença periodontal foi baseado na adaptação de modelo já caracterizado e aceito na literatura científica, e em nosso grupo de trabalho (Bonato, do-Amaral et al. 2012). Os animais foram anestesiados pela administração intraperitoneal da associação de hidrocloreto de quetamina 80 mg/Kg (Cetamim, Syntec; Hortolândia, São Paulo, Brasil) e hidrocloreto de xilazina 10 mg/Kg (Calmium, Agener União; Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil). Após não apresentarem mais reflexos de dor, os animais foram posicionados em mesa odontológica adaptada para roedores, em decúbito ventral tendo a boca mantida aberta por retratores apoiados nos dentes incisivos. O procedimento seguiu com a inserção bilateral de ligadura submarginal de fio de seda (USP 4-0; Diâmetro 0,15 mm) nos primeiros molares inferiores, com amarração mesial (Figura 2). Após um período de 15 dias, os animais foram submetidos à eutanásia, por overdose de anestésico inalatório (Halotano; Tanohalo®, Cristália, Itapina, SP, Brasil), para coleta das amostras (gengivas, hemi-mandíbulas e fêmures). Foram utilizados apenas os animais que apresentaram a ligadura bilateral, devidamente inserida.

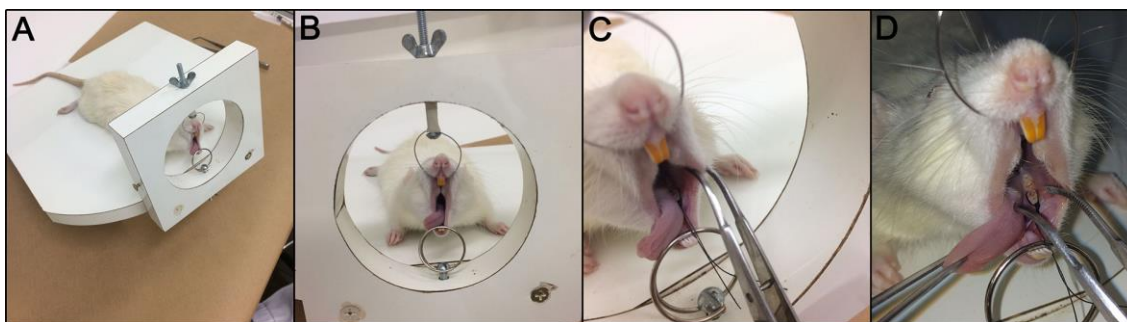


Figura 2 - Fotos realizadas durante a indução da doença periodontal. (A) Posicionamento do animal na mesa de procedimento, (B) Posição dos retratores; (C) Inserção do fio de seda, e (D) Amarração da ligadura.

4.4. Marcação de mastócitos no tecido gengival

As gengivas foram fixadas por 24 horas em solução de formaldeído 10% tamponado (pH 7.4) e posteriormente lavadas em água corrente por 24 horas. O tecido foi então desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol, infiltrado e emblocado em parafina. As peças foram então usadas para microtomia, e as lâminas foram confeccionadas com cortes de 3 µm de espessura. As lâminas foram então coradas por solução aquosa de Azul de Toluidina 1%, para a identificação de mastócitos no tecido gengival.

4.5. Micro tomografia computadorizada (microCT)

Analises tridimensionais por microCT na região do primeiro molar das hemi-mandíbulas direitas e porção distal dos fêmures direitos foram realizadas utilizando um sistema SkyScan 1272 (Bruker microCT; Kontich, Belgium). Os espécimes foram posicionados verticalmente no tomógrafo e as imagens foram adquiridas (70kVp; 142µA; filtro de alumínio 0.5 mm; voxel isotrópico de 9 µm; tempo de exposição de 1100 ms; rotação de 180°, etapa de rotação 0.5°). As imagens foram reconstruídas com o software NRecon (v1.6, Bruker microCT), alinhadas tridimensionalmente com o software DataViewer (v1.5.1.2, Bruker microCT), analisadas com o software CT Analyser (v1.13, Bruker microCT), e posteriormente as imagens tridimensionais representativas de cada grupo foram feitas com o software CTvox (v3.0, Bruker microCT).

4.5.1. Análise do osso alveolar

Uma região de interesse (ROI) foi padronizada a partir de pontos anatômicos determinados (Limite superior: teto da furca; Limite inferior: 100

fatias a partir do teto (900 μm); Limite distal: raiz proximal do 2º molar; Limite proximal: raiz proximal do 1º molar; e Limites vestibular e lingual: limites do osso alveolar). Um volume de interesse (VOI) foi delimitado automaticamente, utilizando o software de análise, considerando as bordas do osso alveolar na região de interesse. Os espaços ocupados pelo dente (coroa e raízes) foram desconsiderados na análise. Foi considerado a porcentagem de osso (BV/TV), número (Tb.N), espessura (Tb.Th) e separação (Tb.Sp) de trabéculas (Bouxsein, Boyd et al. 2010).

4.5.2. Análise da porção distal do fêmur

Duas regiões de interesse (ROI) foram padronizadas, para o osso trabecular (Limite superior: 150 fatias abaixo da placa de crescimento; Limite inferior: 100 fatias a partir do limite superior (900 μm)), e para o osso cortical (Limite superior: ausência de osso trabecular; Limite inferior: 100 fatias abaixo do limite superior (900 μm)). Os volumes de interesse (VOI) foram delimitado automaticamente, utilizando o software de análise, para o osso trabecular (Limites da borda interna do córtex medular) e cortical (limites do osso cortical). Na porção trabecular foi analisado a porcentagem de osso (Tb.BV/TV), SMI (Tb.SMI), número de trabécula (Tb.N), espessura de trabécula (Tb.Th) e separação de trabécula (Tb.Sp), e na porção cortical foi avaliado a espessura da cortical (Co.Th) e porcentagem de porosidade cortical (Co.Po) (Bouxsein, Boyd et al. 2010).

4.6. Dosagem de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) e quimiocinas (CXCL3/CINC-2 e CCL20/MIP-3 α) na mandíbula e fêmur

4.6.1. Extração das amostras

Foi utilizada a porção da mandíbula referente aos dentes molares (corpo da mandíbula) e a porção distal do fêmur. O tecido foi macerado em nitrogênio líquido e posteriormente homogeneizado com tampão de lise (Tris 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 1%, deoxicolato de sódio 0.5% e coquetel inibidor de proteases cOmplete™/Sigma, pH 7.4), na proporção de ± 100 μ g de tecido/800 μ L de tampão em um homogeneizador de tecidos (Omni TH, Omni International; Tulsa, Oklahoma, EUA). As amostras foram então centrifugadas (16000 RCF, 20 minutos, 4 °C), o sobrenadante coletado e o conteúdo de proteínas totais foi determinado pelo método de Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951).

4.6.2. Ensaio ELISA *sandwich* (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Para quantificação das citocinas Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), e quimiocinas CXCL3/CINC-2 e CCL20/MIP-3 α , foi utilizada a técnica *ELISA sandwich*, brevemente descrita a seguir.

Primeiramente, microplacas (96 poços) foram incubadas com os respectivos anticorpos de captura diluídos em PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, KHPO₄ 2 mM, e Na₂HPO₄ 8 mM) (16 horas, 4°C) (R&D systems, Minneapolis, Minnesota, EUA). As placas foram lavadas com solução de lavagem (PBS, Tween 20 1%) e bloqueadas com solução de albumina sérica bovina 1% (ASB 1% em PBS) (1 hora, temperatura ambiente). Em seguida, as placas foram

novamente lavadas, e foram incubadas as respectivas curvas padrões (4000-31.25 pg/mL, diluição seriada de 2x em ASB 1%) e as amostras (3 horas, temperatura ambiente). As placas foram novamente lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos biotinilados (1 hora, temperatura ambiente). Posteriormente as placas foram lavadas e incubadas com avidina conjugada a peroxidase (ExtrAvidin®-Peroxidase, Sigma) (30 minutos, temperatura ambiente, no escuro). As placas foram então lavadas e incubadas com o substrato cromogênico (solução de TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) (30 minutos, temperatura ambiente, no escuro). Ao final, a reação de cor foi interrompida com ácido sulfúrico 1 N, as absorbâncias foram determinadas em 450 nm, as concentrações dos alvos nas amostras foram determinados em relação a curva padrão e depois normalizados pelo respectivo conteúdo de proteínas totais. Os anticorpos utilizados encontram-se listados na Tabela 1.

Tabela 1. Relação dos anticorpos utilizados (R&D systems)

<i>Alvo</i>	<i>Anticorpo de captura</i>	<i>Proteína recombinante</i>	<i>Anticorpo biotinilado</i>
<i>TNF-α</i>	<i>MAB510</i>	<i>510-RT</i>	<i>BAF510</i>
<i>IL-10</i>	<i>MAB519</i>	<i>522-RL</i>	<i>BAF519</i>
<i>IL-6</i>	<i>MAB506</i>	<i>506-RL</i>	<i>BAF506</i>
<i>CXCL3</i>	<i>MAB516</i>	<i>516-CA</i>	<i>BAF516</i>
<i>CCL20</i>	<i>MAB540</i>	<i>540-RM</i>	<i>BAF540</i>

4.7. Análise da expressão gênica de marcadores ósseos

3.7.1. Coleta das amostras

A coleta das amostras destinadas a referida análise foi realizada com técnica asséptica, em campo e material cirúrgico limpo com o reagente de descontaminação RNase Away™ (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific; Carlsbad, CA, USA) e tubos com especificação *PCR clean* (livre de DNase/RNase). As amostras de hemi-mandíbula foram cortadas nas regiões de interesse (região do molares, corpo da mandíbula, ± 100 mg de tecido) e os tecidos moles adjacentes foram removidos. Os fêmures cortados e a porção distal foi utilizada, sendo a medula lavada com água tratada com pirocarbonato de dietila (água-DEPC). Os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio e armazenados a -80°C , até a realização das seguintes etapas.

4.7.2. Extração e quantificação do RNA total

A extração de RNA total foi realizada com reagente Trizol LS (Invitrogen™), com protocolo adaptado a partir do recomendado pelo fabricante. As amostras de tecido (corpo da mandíbula e fêmur distal) foram pulverizadas com gral e pistilo, em nitrogênio líquido, posteriormente foi adicionado ao pó 3 mL do reagente Trizol LS, para homogeneização com o tecido. O homogenato foi transferido para um tubo de 2 mL e centrifugado para clarificação da amostra de partículas de osso não homogeneizadas (14000 RCF, 20 minutos; 4°C). O volume de 1 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo limpo, ao qual foi adicionado 300 μL de clorofórmio, seguido de vigorosa homogeneização em agitador vórtex (2800 rpm; 20 segundos) e incubados por 10 minutos a

temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (13000 RCF; 15 minutos; 4 °C) e a fase aquosa foi coletada (400 µL) em um tubo limpo. Aos tubos, foi adicionado mais 1 mL de Trizol LS e 300 µL de clorofórmio. Os tubos foram vigorosamente agitados e incubados em temperatura ambiente por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas (13000 RCF; 15 minutos; 4 °C) e a fase aquosa foi novamente coletada (400 µL) em um tubo limpo.

Para precipitação do RNA foi adicionados 500 µL isopropanol, e as amostras foram mantidas a -20 °C por 2 horas. Os tubos foram então centrifugados (13000 RCF; 15 minutos; 4°C), o pellet foi lavado em etanol 75% e novamente centrifugado (10000 RCF; 10 minutos; 4°C), o sobrenadante foi descartado e o residual de solução foi evaporado com o tubo invertido. O precipitado foi diluído em 30 µL de água-DEPC e as amostras foram armazenadas a -80 °C, até os procedimentos seguintes.

A quantificação do RNA total foi realizada por fluorometria com o *Quant-iT™ RiboGreen™ RNA Assay Kit* (Invitrogen™) em equipamento Nanodrop 4000 (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. Além disso, a pureza das amostras foi avaliada por espectrofotometria com leituras nos comprimentos de onda de 260 nm (para ácidos nucleicos), 280 nm (para proteínas) e 230 nm (para fenol), considerando as razões 260/280 (satisfatória entre 1.8 - 2.0) e 260/230 (satisfatório entre 2.0 – 2.2). Posteriormente, com o propósito de eliminar possível contaminação por DNA genômico, anteriormente a transcrição reversa, as amostras foram tratadas com kit DNase I (Sigma-Aldrich), seguindo as recomendações do fabricante.

4.7.3 Síntese do DNA complementar e reação em cadeia da polimerase em tempo real

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA total, por reação de transcrição reversa, utilizando o *High Capacity Kit RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação comparativa da expressão dos diferentes alvos foi realizada por reações em cadeia de polimerase em tempo real (*qRT-PCR*) aparelho *StepOne™ Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific). Para as reações, foi utilizado o sistema TaqMan (TaqMan™ Gene Expression Assays, Applied Biosystems™), com sonda conjugada a fluoróforo FAM® e extintor MGB (*FAM fluorophore reporter / non fluorescente quencher MGB*), seguindo as instruções do fabricante, para os alvos descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Relação dos ensaios TaqMan™ utilizados

Fatores de transcrição		
<i>Runx2</i>	Runt-related transcription factor 2	<i>Rn01512298_m1</i>
<i>Osx/Sp7</i>	Osterix/Sp7 transcription factor	<i>Rn02769744_s1</i>
<i>Catnb</i>	β-catenin/cadherin associated protein beta 1	<i>Rn00584431_g1</i>
Marcadores de formação óssea		
<i>Alp</i>	Bone alkaline phosphatase	<i>Rn01516028_m1</i>
<i>Col1a1</i>	Collagen type I alpha 1	<i>Rn01463848_m1</i>
<i>Opn/Spp1</i>	Osteopontina / secreted phosphoprotein 1	<i>Rn00681031_m1</i>
<i>Ocn/Bglap</i>	Osteocalcin / bone gamma-carboxyglutamate protein	<i>Rn00566386_g1</i>
<i>Bsp/Ibsp</i>	Bone sialoprotein / integrin-binding sialoprotein	<i>Rn00561414_m1</i>
<i>Bmp2</i>	Bone morphogenetic protein 2	<i>Rn00567818_m1</i>
Marcadores de reabsorção / Remodelamento ósseo		
<i>Opg</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b	<i>Rn00563499_m1</i>
<i>Rankl</i>	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11	<i>Rn00589289_m1</i>
<i>Rank</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11a	<i>Rn04340164_m1</i>
<i>Trap/Acp5</i>	Acid phosphatase 5, tartrate resistant	<i>Rn00569608_m1</i>
<i>Mmp2</i>	Matrix metalloproteinase 2	<i>Rn01538170_m1</i>
<i>Mmp9</i>	Matrix metalloproteinase 9	<i>Rn00579162_m1</i>
<i>Ctsk</i>	Cathepsin K	<i>Rn00580723_m1</i>
<i>Oscar</i>	Osteoclast associated immunoglobulin-like receptor	<i>Rn01530958_m1</i>
<i>Vtn</i>	Vitronectin	<i>Rn01466920_g1</i>
<i>Itgav</i>	Integrin, alpha V	<i>Rn01485633_m1</i>
<i>Itgb5</i>	Integrin, beta 5	<i>Rn01439348_m1</i>
Citocinas		
<i>Il1b</i>	Interleukin 1 beta	<i>Rn00580432_m1</i>
<i>Tnfa</i>	Tumor necrosis factor alpha	<i>Rn99999017_m1</i>
<i>Il6</i>	Interleukin 6	<i>Rn01410330_m1</i>
Gene constitutivo (<i>Housekeeping gene</i>)		
<i>Actb</i>	Beta actin	<i>Rn00667869_m1</i>

Para eleição da diluição do cDNA melhor eficiência de reação, foram realizadas diluições seriadas de um *pool* de cDNA das amostras (1:2, 1:4; 1:8; 1:16, e 1:32). Os ensaios foram então conduzidos as amostras nas diluições de 1:8 ou 1:4 com reagentes *Taqman® Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems™) e ensaio inventariado, seguindo as etapas de reação como determinado pelo fabricante (Passo 1: 2 minutos a 50 °C; Passo 2: 10 minutos a 95 °C; e Passo 3: 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minutos e 60 °C). Uma reação negativa (água) foi feita para cada um dos ensaios, como controle negativo.

4.7.4 Análise dos dados de expressão gênica

Os níveis de expressão dos genes alvo foi determinada por método de Ct comparativo, com a equação Quantificação Relativa ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak and Schmittgen 2001). De maneira breve, para o cálculo do RQ de cada amostra, foi utilizado o valor de *Ct* (*cycle threshold* ou ciclo limiar) do gene alvo e constitutivo (*Actb*). O valor do *Ct* do gene alvo foi subtraído do valor do *Ct* do gene constitutivo, resultando no valor de ΔCt ; que por sua vez foi subtraído do valor do ΔCt do calibrador (grupo referência, Wistar Controle), para resultar no valor de $\Delta\Delta Ct$. Este valor foi utilizado na fórmula do RQ, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do constitutivo (Livak and Schmittgen 2001).

4.8. Análise estatística

A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram avaliados pelos testes de *Shapiro-Wilk*, e a partir destes resultados, foi aplicado teste paramétrico, análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*), seguido de teste *post hoc* de *Sidak*, incluindo as comparações Controle vs DP, DP vs 48/80+DP, e Wistar vs SHR nas mesmas condições experimentais.

Os gráficos representam os dados como a média e o erro padrão da média (SEM, *standard error of the mean*) Os níveis de significância são indicados pelo valor ajustado de p, como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), e **** ($p < 0.0001$). As análises foram realizadas no software estatístico Graph Pad Prism v7.0 (GraphPad Software Inc.; San Diego, Califórnia, USA).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Mastócitos são mais frequentes na gengiva de animais com doença periodontal

Inicialmente, identificamos a presença de mastócitos no tecido gengival, pela coloração com Azul de Toluidina. Nos grupos Wistar e SHR controle (WC e SC) foram observados raros mastócitos, entretanto, nos grupos com doença periodontal (WDP e SPD), a frequência destas células foi maior, como é possível visualizar na Figura 3-1 B,b e Figura 3-2 E,e (mastócitos apontados pelas setas). Em contrapartida, como esperado, nos grupos depletados de mastócitos, pelo tratamento prévio com composto 48/80, estas células foram muito menos numerosas.

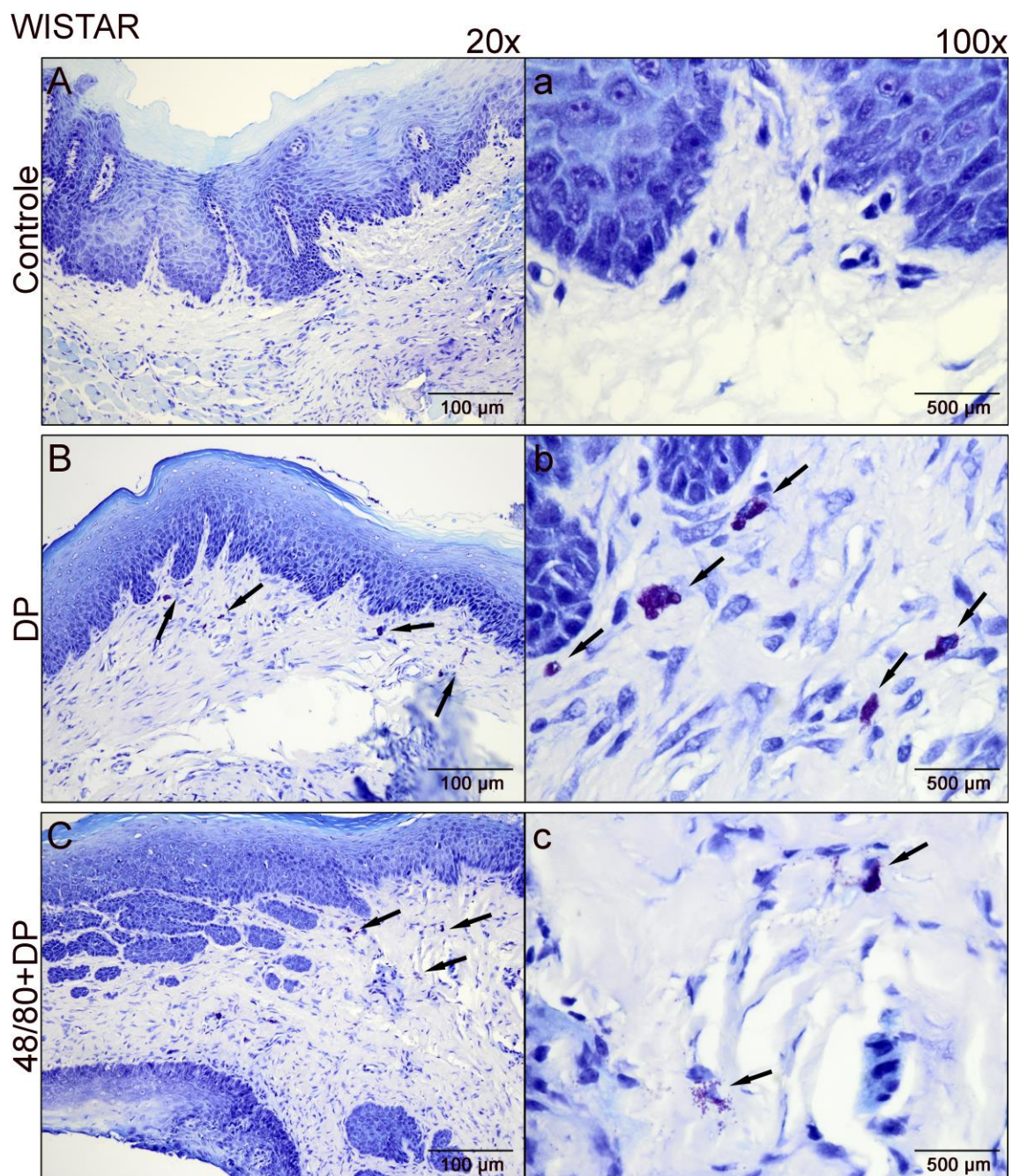


Figura 3-1. Fotomicrografia do tecido gengival, corado com Azul de Toluidina. (A,a) Wistar controle, (B,b) Wistar com doença periodontal, e (C,c) Wistar com doença periodontal previamente depletado de mastócitos. A figura mostra imagens representativas (n=4), com tratamento de contraste. Setas pretas identificam os mastócitos, corados em roxo.

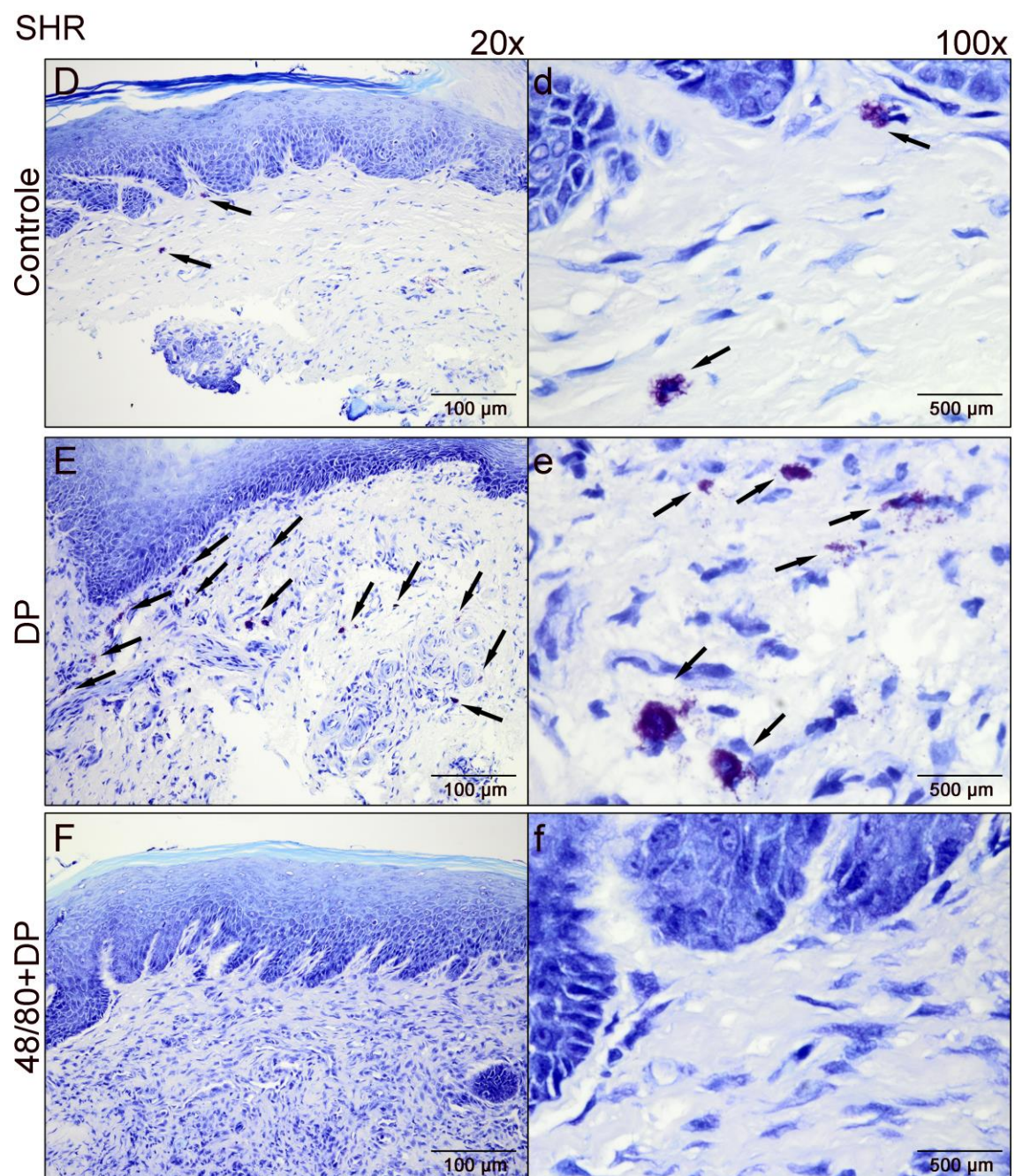


Figura 3-2. Fotomicrografia do tecido gengival, corado com Azul de Toluidina. (D,d) SHR controle, (E,e) SHR com doença periodontal, e (F,f) SHR com doença periodontal previamente depletado de mastócitos. A figura mostra imagens representativas (n=4), com tratamento de contraste. Setas prestas identificam os mastócitos, corados em roxo.

5.2. A depleção de mastócitos previne a perda óssea alveolar induzida pela doença periodontal, principalmente em SHR

Primeiramente, analisamos a perda óssea alveolar e os parâmetros de arquitetura óssea por micro tomografia computadorizada (microCT) em mandíbulas de Wistar e SHR com 15 dias de doença periodontal, depletados ou não de mastócitos.

Os grupos WC e SC apresentaram parâmetros similares de porcentagem e arquitetura óssea (%BV/TV, Tb.N, Tb.Th e Tb.Sp). Por outro lado, os grupos Wistar e SHR com doença periodontal (WPD e SPD) apresentaram perda óssea significativa, observada pela menor porcentagem de volume ósseo, em relação aos respectivos controles ($p < 0.05$ e $p < 0.001$, respectivamente), o que foi mais significativo nos animais SHR ($p < 0.01$). No entanto, a DP não alterou significativamente o número, espessura e espaçamento trabecular (Tb.N, Tb.Th e Tb.Sp) (Figura 4B, C e D).

De maneira interessante, depleção prévia de mastócitos reduziu a perda óssea alveolar induzida pela DP nos animais Wistar (5%, $p = 0.550$) e, mais significativamente em SHR (10%, $p < 0.01$), enquanto a arquitetura trabecular não foi significativamente alterada.

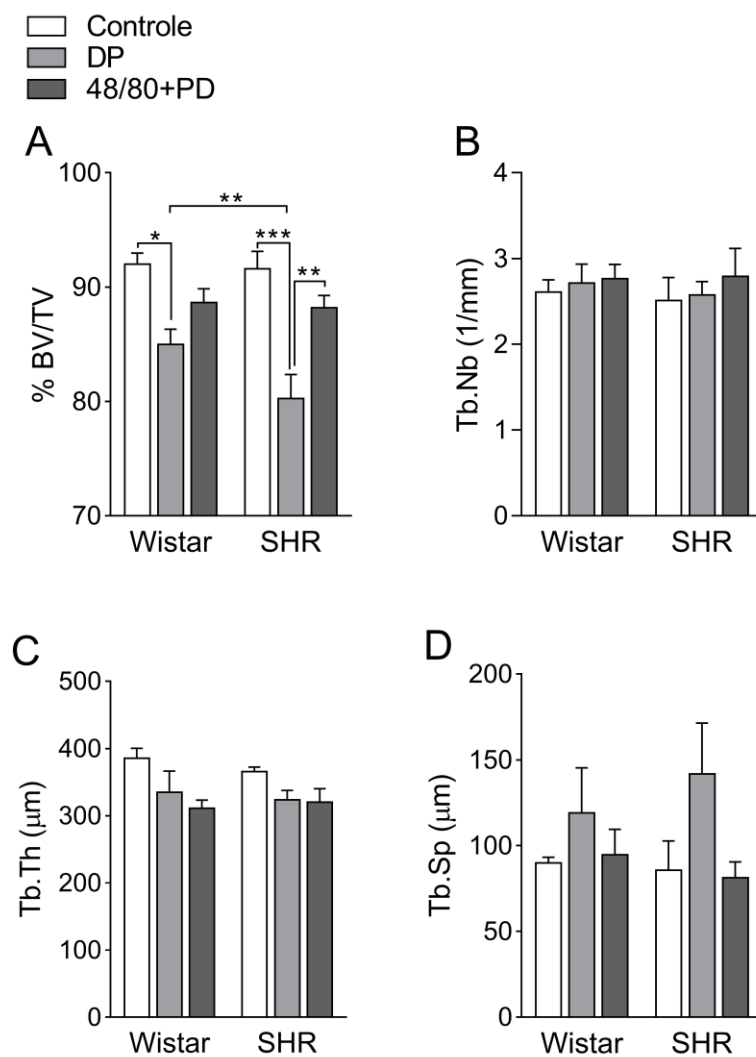


Figura 4 - Análise de microCT do osso alveolar de animais Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos. (A) Porcentagem óssea, (B) Número de trabéculas, (C) Espessura de trabéculas, (D) Separação de trabéculas. Gráficos representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=5). Diferenças estatísticas expressas por * ($p<0.05$), ** ($p<0.01$), ***($p<0.001$) e **** ($p<0.0001$).

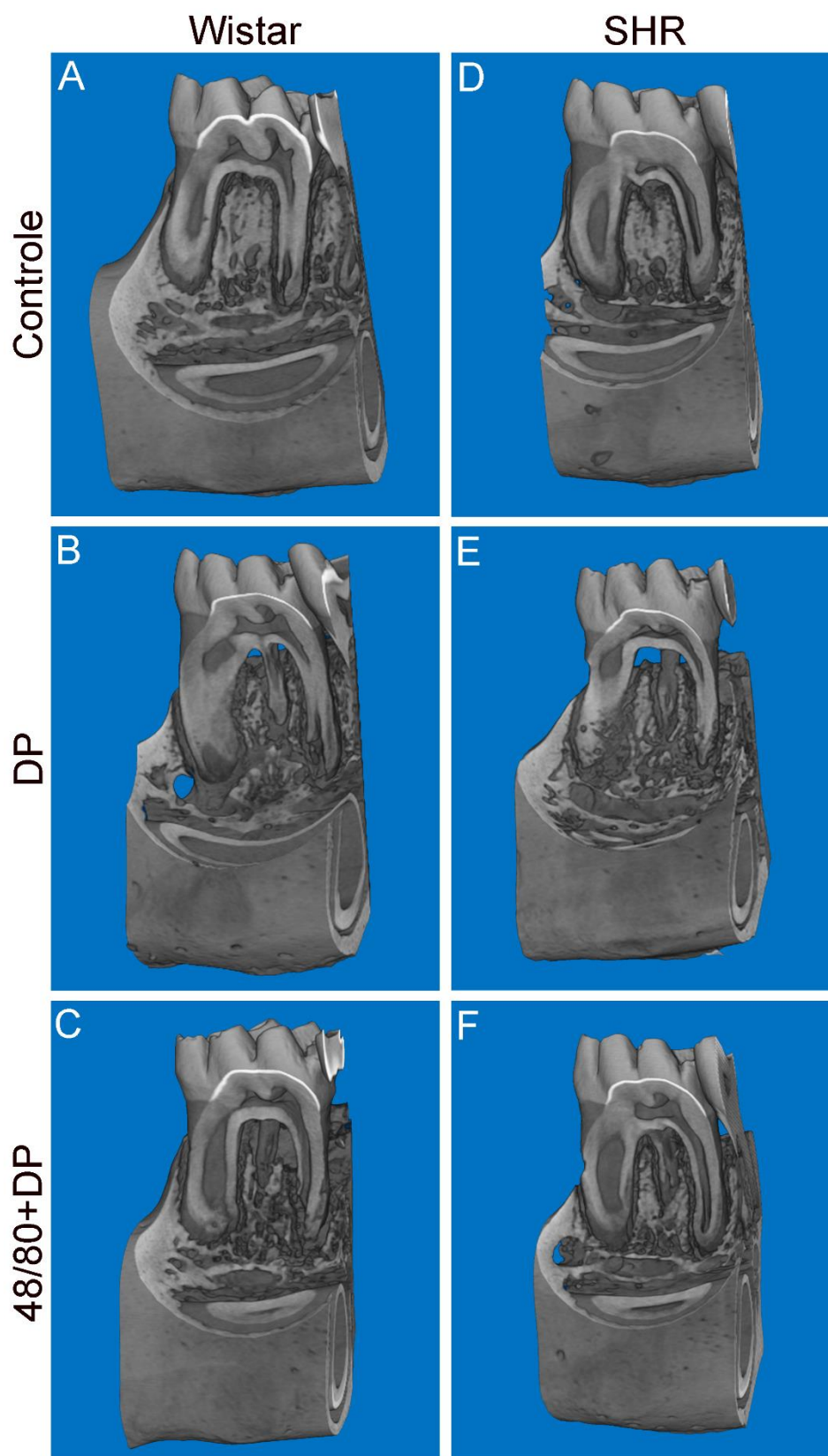


Figura 5 - Reconstrução tridimensional da mandíbula (região do primeiro molar) de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos. Imagens representativas dos grupos (A) WC, (B) WDP, (C) W48/80, (D) SC, (E) SDP, e (F) S48/80.

5.3. A depleção de mastócitos reduz a expressão de citocinas induzida pela doença periodontal em SHR

Ademais, avaliamos também a expressão gênica das citocinas *IL1b*, *Tnfa* e *IL6*, em mandíbula, nas condições experimentais propostas.

Em reação aos grupos controle, não houveram diferenças constitutivas na expressão das citocinas analisadas, entretendo nos grupos com DP, foram observadas diferenças significativas. O grupo WPD apresentou maior expressão de *Tnfa* ($p<0.05$) e *IL6* ($p<0.05$), comparada a WC. Nos animais SHR, o grupo SDP apresentou maior expressão de todas as citocinas analisadas *IL1b* ($p<0.001$), *Tnfa* ($p<0.01$), e *IL6* ($p<0.01$), em relação a SC, além de maior expressão de *IL1b* ($p<0.05$) e *IL6* ($p<0.05$), comparado a WDP.

A depleção de mastócitos nos grupo W48/80 não levou a alterações significativas, mas nos grupo S48/80 houve redução significativa da expressão de *IL1b* ($p<0.05$) e *IL6* ($p<0.05$), em relação a SPD.

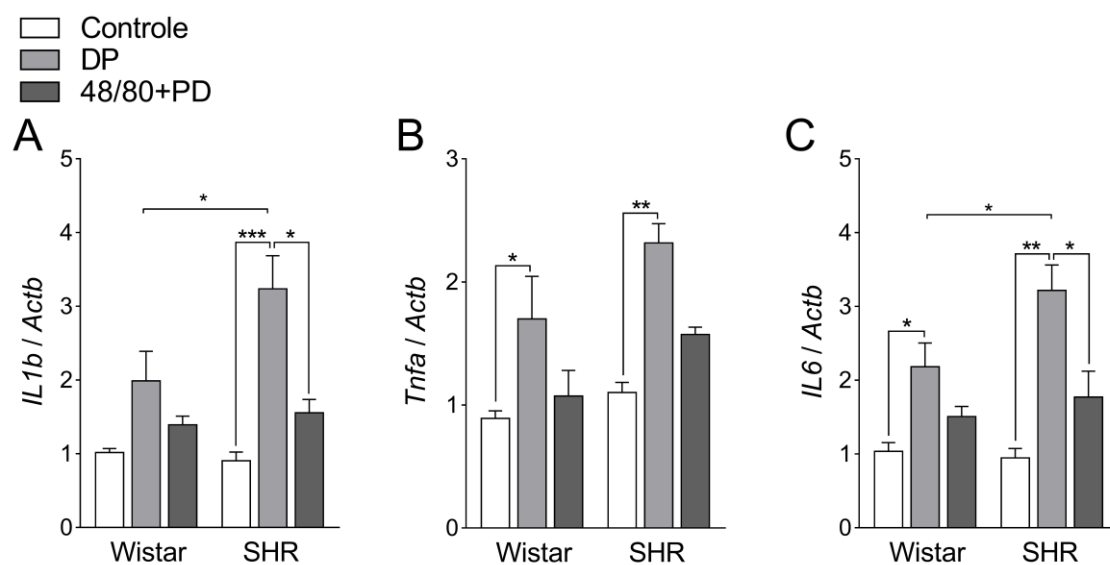


Figura 6 - Expressão gênica das citocinas (A) *IL1b*, (B) *Tnfa* e (C) *IL6* em mandíbula de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos. Gráficos representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Diferenças estatísticas expressas por * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) e **** ($p < 0.0001$).

5.4. A depleção de mastócitos reduz a produção de mediadores inflamatórios na mandíbula, principalmente SHR

No intuito de corroborar com os dados de expressão gênica, quantificamos a produção das citocinas TNF- α , IL-6, IL-10, e quimiocinas CXCL3/CINC-2 e CCL20/MIP-3 α , em mandíbula, nas condições experimentais propostas. Em relação as diferenças constitutivas entre os grupos controle, SC apresentou maior produção de IL-6 ($p < 0.01$), CXCL3 ($p < 0.05$) e CCL20 ($p < 0.01$), em relação a WC.

A doença periodontal levou a maior produção de todos os alvos analisados em ambas linhagem, em relação aos respectivos controles, exceto pela quimiocinas CCL20, sendo os aumentos de TNF- α , IL-6 e CXCL3 maiores no grupo SDP, comparado a WPD. A depleção de mastócitos levou a menor produção de IL-6 ($p < 0.05$), e CXCL3 ($p < 0.01$) no grupo W48/80, em relação ao WDP, já no grupo S48/80 houve redução da produção TNF- α ($p < 0.001$), IL-6 ($p < 0.05$), e CXCL3 ($p < 0.001$). A produção de IL-10 e CCL20 não foi alterada pela depleção de mastócitos.

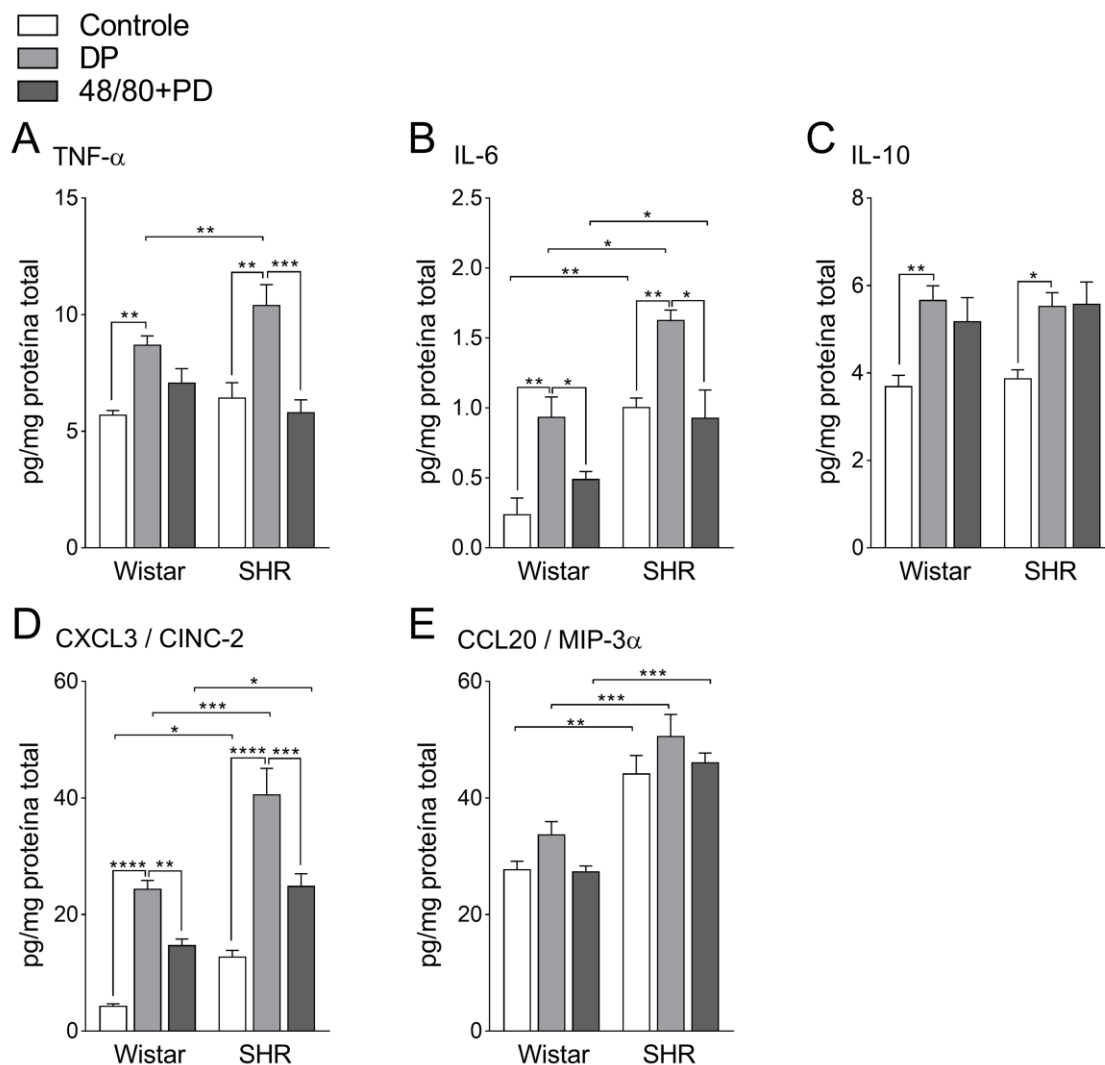


Figura 7 - Produção das citocinas (A) TNF- α , (B) IL-6, (C) IL-10 e das quimiocinas (D) CXCL3/CINC-2 e (E) CCL20/MIP-3 α em mandíbula de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos. Gráficos representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Diferenças estatísticas expressas por * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) e **** (p<0.0001).

5.5. Depleção de mastócitos reduz a expressão de *Runx2* e *Catnb* em mandíbulas de SHR com doença periodontal

Com objetivo de avaliar o papel local dos mastócitos nas expressão gênica de marcadores de formação óssea, primeiramente analisamos três importantes fatores de transcrição, *Runx2*, *Osx* e *Catnb*, em mandíbula, no modelo experimental proposto. Em relação as diferenças constitutivas entre as linhagens Wistar e SHR, SC apresentou menor expressão de *Runx2* ($p<0.01$), enquanto a expressão de *Osx* e *Catnb* foram similares.

O grupo WDP não apresentou alterações significativas na expressão dos fatores de transcrição analisados, comparado a WC, entretanto, a depleção prévia de mastócitos reduziu a expressão *Catnb* ($p<0.05$), comparado a WPD.

No grupo SPD houve um aumento significativo da expressão de *Catnb* ($p<0.05$), comparado a WC, e a depleção prévia de mastócitos levou a redução significativa de *Runx2* ($p<0.05$) e *Catnb* ($p<0.0001$), comparado a SPD.

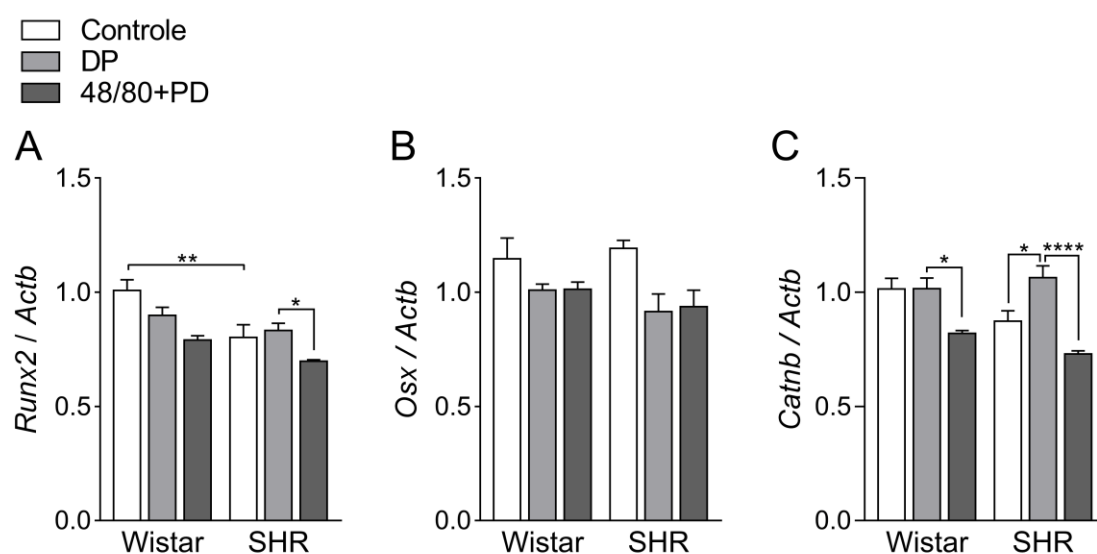


Figura 8 - Expressão gênica dos fatores de transcrição (A) Runx2, (B) Osx e (C) Catnb em mandíbula de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos. Gráficos representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Diferenças estatísticas expressas por * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) e **** (p<0.0001).

5.6. Depleção de mastócitos previne o aumento da expressão de *Opn* induzida por doença periodontal em mandíbula

Posteriormente, avaliamos a expressão gênica de *Alp*, *Col1a1*, *Opn*, *Ocn*, *Bsp*, e *Bmp2*, em mandíbula, no modelo experimental proposto. O grupo SC apresentou expressão reduzida de *Opn* e *Bmp2* ($p<0.05$ e $p<0.01$, respectivamente), comparados ao grupo WC, enquanto a expressão dos demais alvos avaliados mostrou-se semelhante.

A doença periodontal nos animais Wistar levou a redução da expressão de *Alp* ($p<0.0001$) e aumento de *Opn* ($p<0.05$), enquanto a depleção prévia de mastócitos foi capaz de reduzir a expressão de *Opn* ($p<0.01$), comparado ao grupo WPD.

Nos animais SHR, a doença periodontal causou redução da expressão de *Alp* ($p<0.001$) e aumento de *Opn* ($p<0.01$), similar ao grupo WPD. A depleção prévia de mastócitos também preveniu o aumento de *Opg* ($p<0.05$), e além disso, levou a redução da expressão de *Col1a1* ($p<0.05$) e *Bmp2* ($p<0.05$).

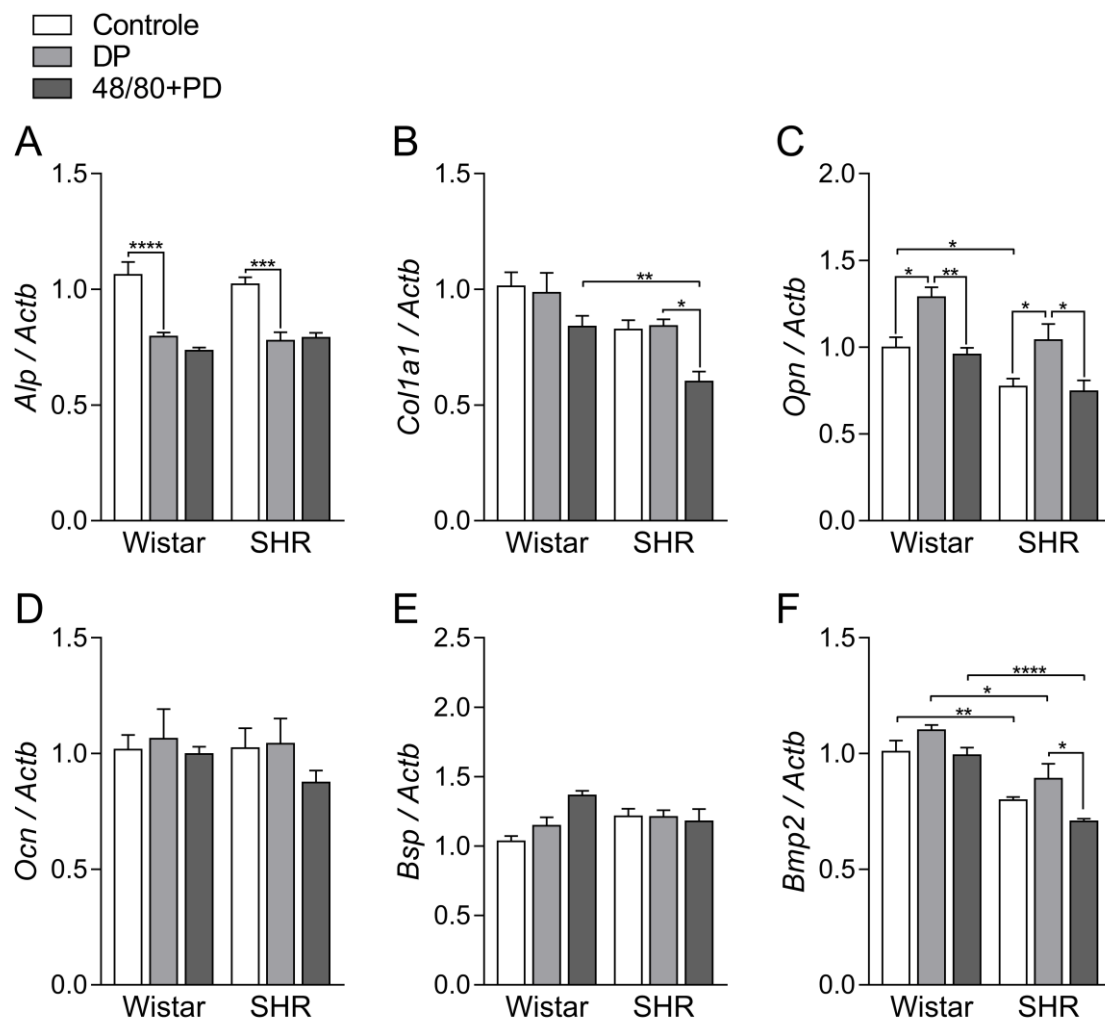


Figura 9 - Expressão gênica dos marcadores de formação óssea (A) *Alp*, (B) *Col1a1*, (C) *Opn*, (D) *Ocn*, (E) *Bsp*, e (F) *Bmp2* em mandíbula de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos. Gráficos representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Diferenças estatísticas expressas por * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) e **** (p<0.0001).

5.7. Depleção de mastócitos previne as alterações no eixo *Opg*/*Rankl*/*Rank* induzidas por doença periodontal na mandíbula de Wistar e SHR

Avaliamos também a expressão dos componentes do eixo *Opg*/*Rankl*/*Rank*. Nosso resultados evidenciaram que a expressão de *Opg* no grupo SC foi constitutivamente menor ($p < 0.001$), comparado a WC, enquanto a expressão de *Rankl* e *Rank* foi similar.

No grupo WDP houve redução da expressão de *Opg* ($p < 0.01$), e aumento de *Rankl* ($p < 0.0001$) e *Rank* ($p < 0.05$), comparado a WC, e a depleção prévia de mastócitos reduziu a expressão de *Opg* ($p < 0.05$), *Rankl* ($p < 0.001$) e *Rank* ($p < 0.01$), comparado a WPD.

No grupo SDP houve aumento da expressão de todos os alvos *Opg* ($p < 0.0001$), *Rankl* ($p < 0.0001$) e *Rank* ($p < 0.01$), comparado a SC, e a depleção de mastócitos preveniu estas alterações, visto que foram observadas reduções da expressão de *Opg* ($p < 0.0001$), *Rank* ($p < 0.0001$) e *Rank* ($p < 0.0001$), comparado a SPD.

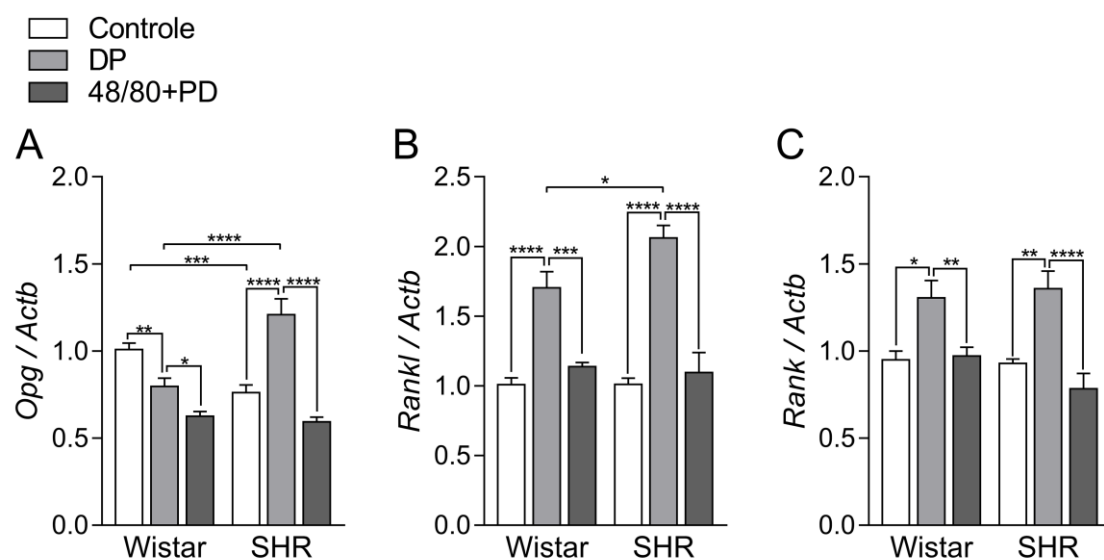


Figura 10 - Expressão gênica de marcadores de remodelação óssea (A) *Opg*, (B) *Rankl* e (C) *Rank* em mandíbula de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos. Gráficos representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Diferenças estatísticas expressas por * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) e **** ($p < 0.0001$).

5.8. Depleção prévia de mastócitos previne as alterações em marcadores de reabsorção óssea em mandíbula de Wistar e SHR com doença periodontal

Nosso próximo passo foi avaliar os marcadores de reabsorção óssea *Trap*, *Mmp2*, *Mmp9*, *Ctsk*, *Oscar*, *Vtn*, *Itga5*, e *Itgb5*, buscando compreender os mecanismos envolvidos na resposta observada. O grupo SC apresentou constitutivamente maior expressão de *Trap* ($p<0.0001$), *Mmp9* ($p<0.01$), *Mmp2* ($p<0.0001$), e *Oscar* ($p<0.01$), comparado a WC.

Em relação ao grupo WDP, houve um aumento significativo da expressão de todos os marcadores avaliados, exceto por *Vtn*, e a depleção prévia de mastócitos foi capaz de reduzir a expressão de *Trap*, *Mmp2*, *Itga5* e *Itgb5*, e *Vtn*, comparado a WPD.

No grupo SDP, houve aumento significativo da expressão de todos os marcados avaliados, exceto por *Mmp2*, e a depleção prévia de mastócitos foi capaz diminuir esta resposta para *Trap*, *Ctsk*, *Vtn*, *Itga5*, e *Itgb5*. A expressão de *Mmp2* manteve-se sem alterações, semelhante a SC, e a expressão de *Oscar* manteve-se aumentada, similar a SDP.

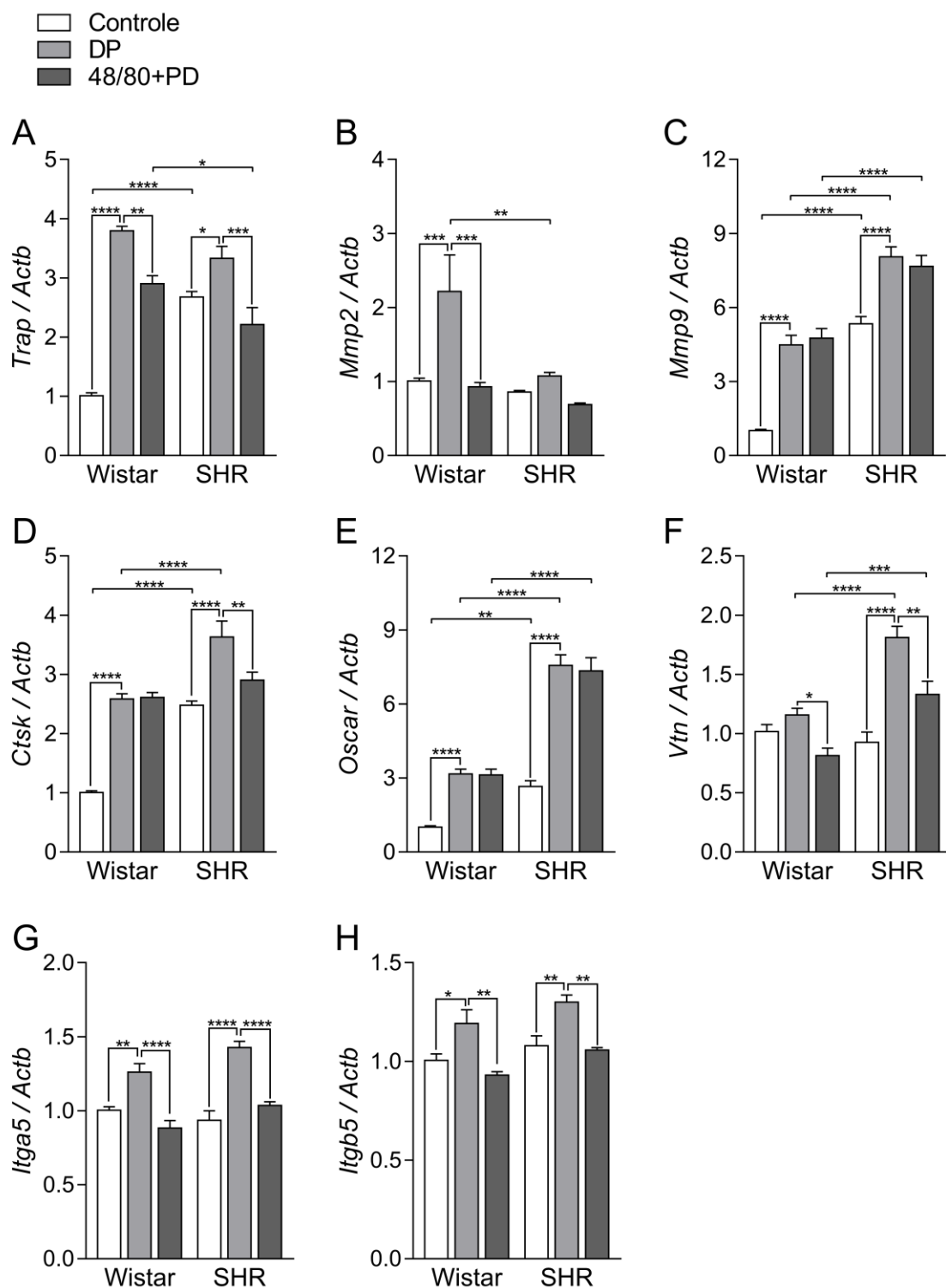


Figura 11 - Expressão gênica dos marcadores de reabsorção óssea (A) *Trap*, (B) *Mmp2*, (C) *Mmp9*, (D) *Ctsk*, (E) *Oscar*, (F) *Vtn*, (G) *Itga5*, e (H) *Itgb5* em mandíbula de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos. Gráficos representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Diferenças estatísticas expressas por * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) e **** (p<0.0001).

5.9. Doença periodontal não altera a arquitetura óssea do fêmur de Wistar e SHR

Posteriormente, no intuito de avaliar os efeitos da doença periodontal e da depleção prévia de mastócitos sobre o metabolismo ósseo sistêmico, avaliamos a arquitetura óssea na porção proximal do fêmur, no modelo experimental proposto. Nossos resultados não evidenciaram diferenças significativas entre os grupos WC e SC, exceto pela porosidade cortical, que foi aumentada nos animais SHR ($p < 0.05$).

Em relação a doença periodontal, não observamos alterações nos parâmetros analisados, em relação aos grupos controle, entretanto o grupo SDP apresentou menor porcentagem óssea trabecular (Tb.BV/TV), quando comparado ao grupo WDP ($p < 0.05$). Da mesma forma, a depleção prévia de mastócitos não alterou o perfil de resposta de maneira significativa, entretanto, o grupo S48/80 apresentou maior porcentagem de porosidade cortical, em relação ao grupo W48/80 ($p < 0.05$).

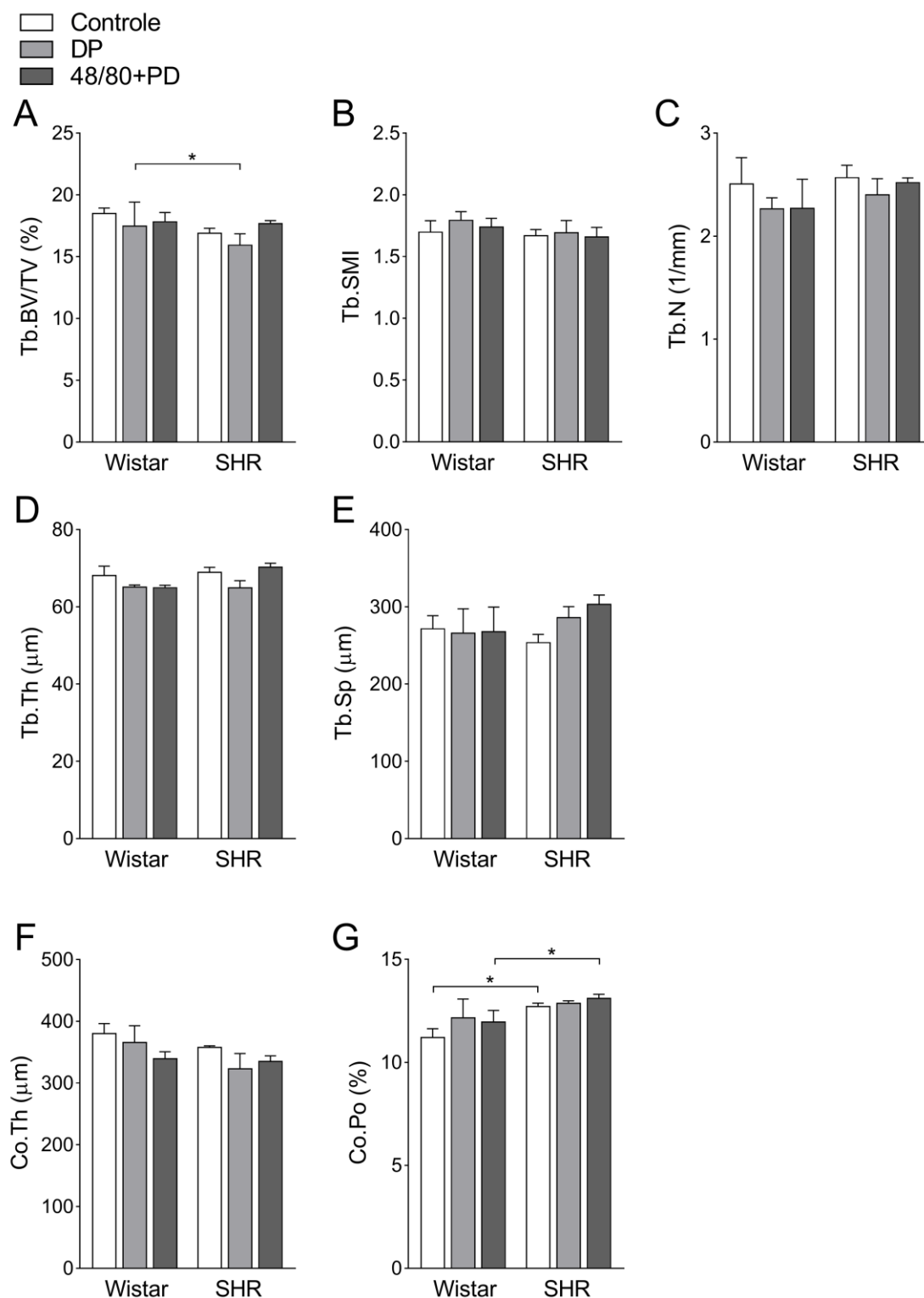


Figura 12 - Análise de microCT do fêmur distal de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos. (A) Porcentagem óssea trabecular, (B) SMI trabecular, (C) Número de trabéculas, (D) Espessura de trabéculas, (E) Separação de trabéculas, (F) Espessura cortical, e (G) Porcentagem de porosidade cortical. Gráficos representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=5). Diferenças estatísticas expressas por * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) e **** (p<0.0001).

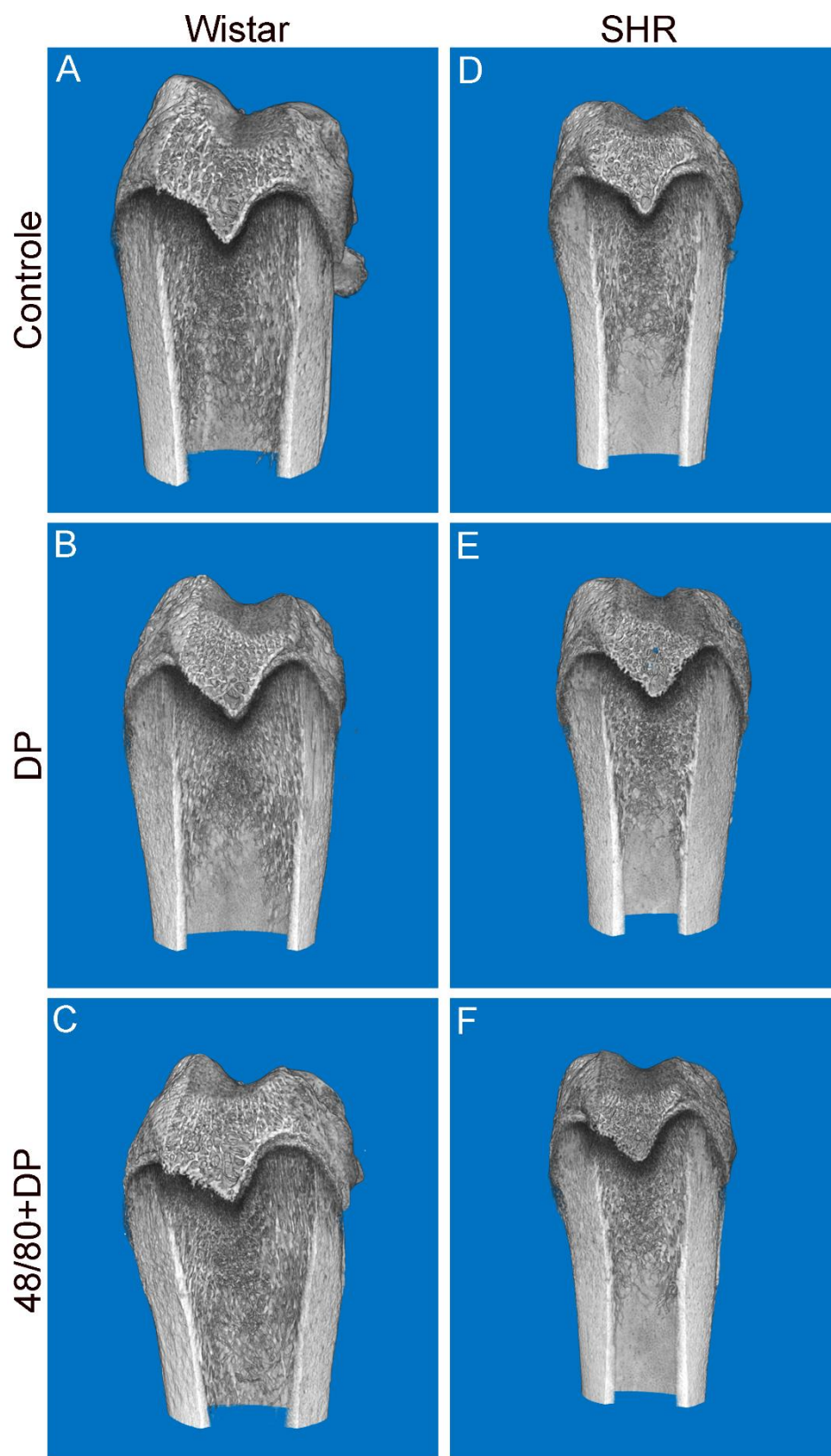


Figura 13 - Reconstrução tridimensional do fêmur (região distal) de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos. Imagens representativas dos grupos (A) WC, (B) WDP, (C) W48/80, (D) SC, (E) SDP, e (F) S48/80.

5.10. Expressão e produção de citocinas no fêmur

Não foi possível a quantificação dos mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-6, IL-10, CXCL3, e CCL20) pelo ensaio de ELISA, bem como a quantificação relativa da expressão de Tnfa, Il6 e Il10, visto que os analitos nas amostras encontrava-se abaixo dos limites de detecção dos ensaios propostos.

5.11. Depleção de mastócitos reduziu a expressão de fatores de transcrição no fêmur de animais com doença periodontal

Apesar de não termos observado diferenças na arquitetura óssea do fêmur, no modelo experimental proposto, decidimos avaliar a expressão gênica de marcadores ósseos, no intuito de evidenciar possíveis alterações induzidas pela doença periodontal, bem como o efeito da depleção dos mastócitos.

Portanto, primeiramente avaliamos a expressão dos fatores de transcrição *Runx2*, *Osx* e *Ctnb*. Não foram observadas diferenças constitutivas significativas entre WC e SC, entretanto, a doença periodontal, no grupo WDP, observou-se aumento da expressão de *Runx2* ($p < 0,001$), em relação a WC, e a depleção prévia de mastócitos foi capaz de reduzir esta resposta ($p < 0,05$).

Por outro lado, no grupo SDP, não foram observadas diferenças significativas, como observado em WDP, porém a depleção prévia de mastócitos foi capaz de reduzir a expressão de *Runx2* ($p < 0,001$), *Osx* ($p < 0,0001$) e *Catnb* ($p < 0,0001$), de maneira mais significativa que o observado em W48/80.

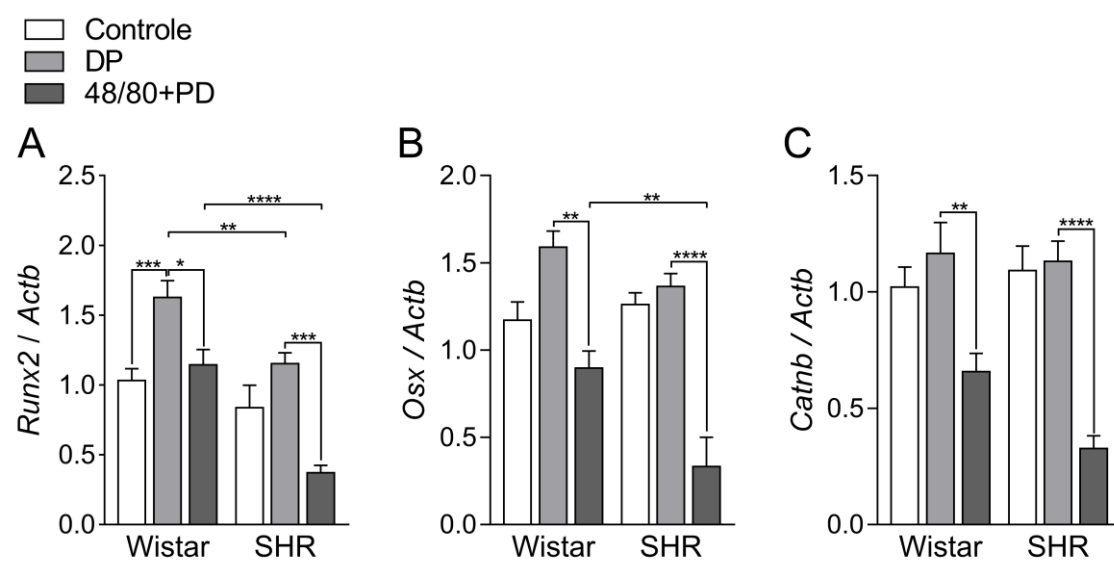


Figura 14 - Expressão gênica dos fatores de transcrição (A) Runx2, (B) Osx e (C) Catnb no fêmur de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos. Gráficos representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Diferenças estatísticas expressas por * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) e **** ($p < 0.0001$).

5.12. O aumento da expressão de marcadores de formação óssea no fêmur, induzido pela doença periodontal, tem participação dos mastócitos

Na sequência, avaliamos a expressão dos marcadores de formação óssea no fêmur no modelo proposto. Em relação as diferenças constitutivas entre Wistar e SHR, o grupo SC apresentou menor expressão de *Alp* ($p < 0.05$) e *Col1a1* ($p < 0.001$), em relação a WC.

Em relação aos efeitos da doença periodontal, no grupo WDP observamos maior expressão de *Col1a1* ($p < 0.01$), *Opn* ($p < 0.0001$), *Ocn* ($p < 0.001$) e *Bsp* ($p < 0.01$), em relação a WC, e a depleção prévia de mastócitos foi capaz de reduzir significativamente a expressão de *Opn* ($p < 0.001$), em relação a WDP.

No grupo SDP, observamos apenas aumenta da expressão de *Opn* ($p < 0.05$), entretanto a depleção prévia de mastócitos levou redução da expressão de *Alp* ($p < 0.0001$) e *Opn* ($p < 0.0001$), de maneira mais significativa que o observado no grupo W48/80.

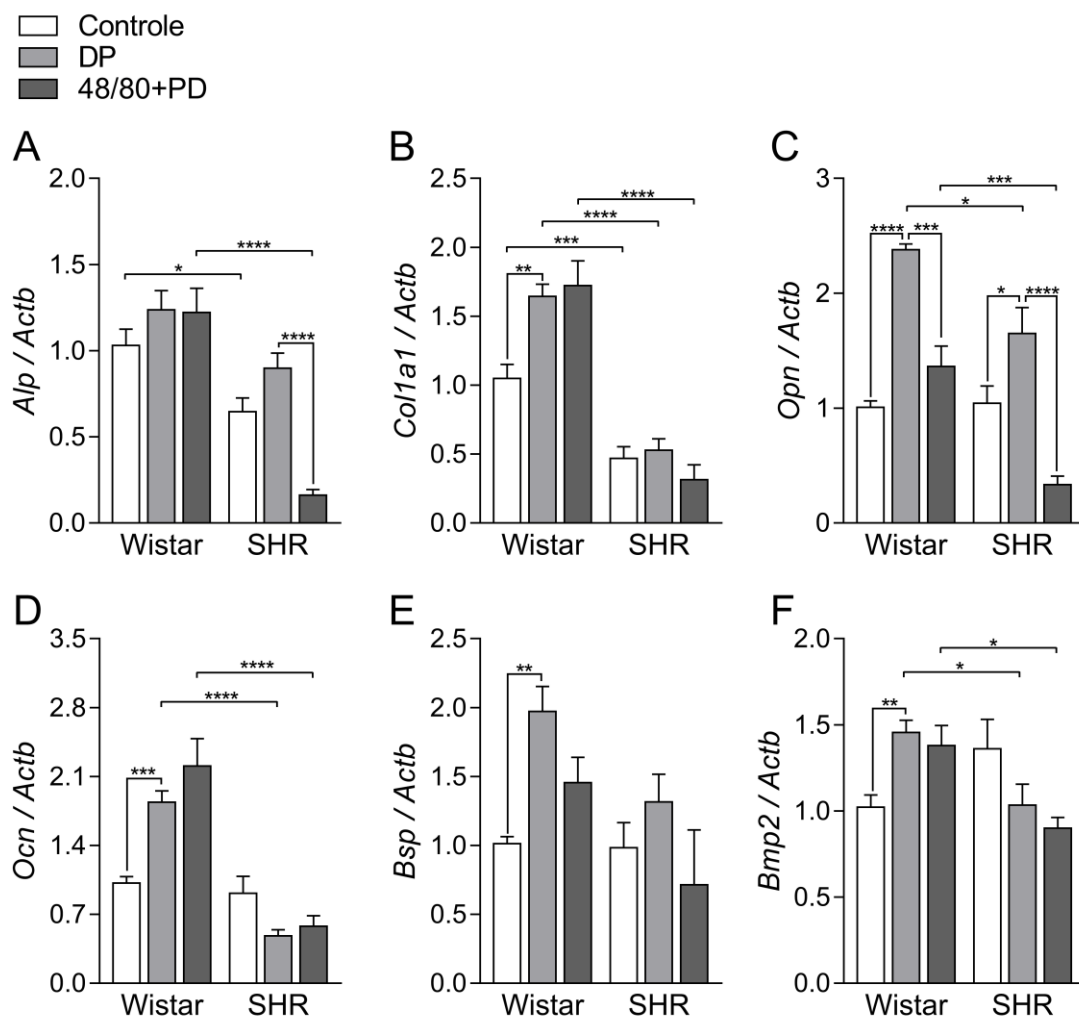


Figura 15 - Expressão gênica dos marcadores de formação óssea (A) *Alp*, (B) *Col1a1*, (C) *Opn*, (D) *Ocn*, (E) *Bsp*, e (F) *Bmp2* no fêmur de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos. Gráficos representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Diferenças estatísticas expressas por * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) e **** (p<0.0001).

5.13. O aumento da expressão de *Opg*/*Rankl*/*Rank* no fêmur, induzido pela doença periodontal, tem participação dos mastócitos

No passo seguinte, avaliamos a expressão gênica do eixo *Opg*/*Rankl*/*Rank* em fêmur no modelo experimental proposto. Wistar e SHR não apresentaram diferenças constitutivas. Em Wistar, a doença periodontal levou a expressão aumentada de *Opg* ($p<0,01$), *Rankl* ($p<0,05$) e *Rank* ($p<0,05$), e a depleção de mastócitos reduziu significativamente todos os alvos. No SHR, a doença periodontal aumentou a expressão de *Rankl* ($p<0.01$), enquanto a depleção de mastócitos foi capaz de diminuir a expressão de *Opg* ($p<0.001$), *Rankl* ($p<0.001$) e *Rank* ($p<0,05$).

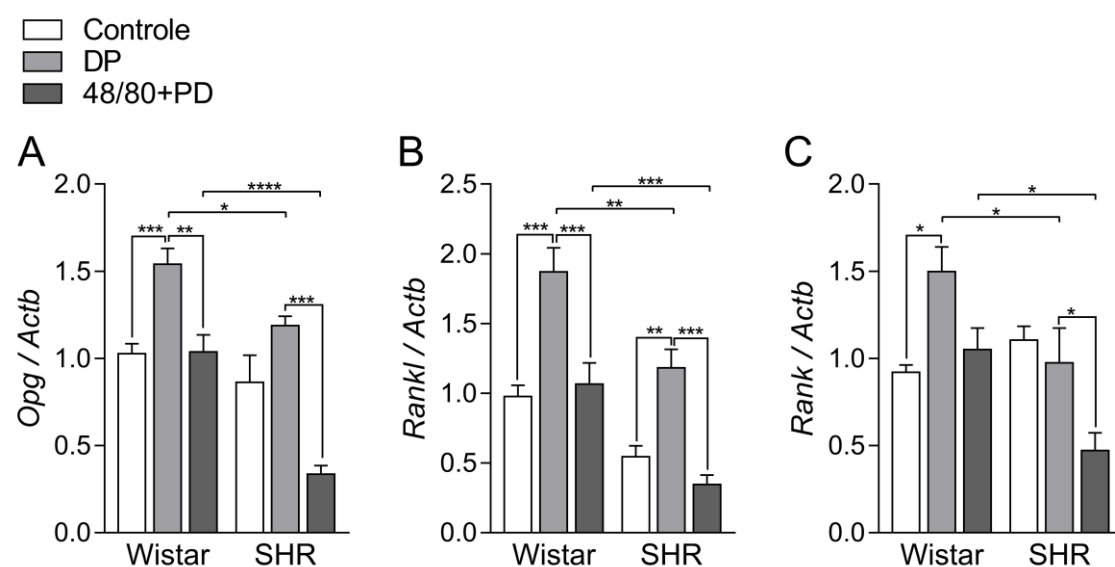


Figura 16 - Expressão gênica de marcadores de remodelação óssea (A) *Opg*, (B) *Rankl* e (C) *Rank* no fêmur de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos. Gráficos representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Diferenças estatísticas expressas por * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001) e **** (p<0.0001).

5.14. O aumento da expressão dos marcadores de reabsorção óssea, induzido pela doença periodontal, tem participação dos mastócitos

Finalmente, avaliamos a expressão de marcadores de reabsorção óssea em fêmur, no modelo experimental proposto. Em relação as diferenças constitutivas entre Wistar e SHR, o grupo SC apresentou maior expressão de *Mmp9* ($p < 0.05$) e *Vtn* ($p < 0.0001$), em relação a WC.

Em relação a doença periodontal nos animais Wistar, o grupo WDP apresentou maior expressão de *Trap* ($p < 0.01$), *Mmp2* ($p < 0.001$), *Mmp9* ($p < 0.01$), *Ctsk* ($p < 0.05$), *Itga5* ($p < 0.0001$) e *Itgb5* ($p < 0.001$), em relação a WC, e a depleção prévia de mastócitos reduziu a expressão de *Vtn* ($p < 0.05$), *Itga5* ($p < 0.0001$) e *Itgb5* ($p < 0.0001$), em relação a WPD.

No grupo SDP houve aumento de *Trap* ($p < 0.001$), *Mmp9* ($p < 0.01$), *Oscar* ($p < 0.05$) e *Itgb5* ($p < 0.05$), em relação a SC, enquanto a depleção prévia de mastócitos foi capaz de reduzir significativamente a expressão de *Trap* ($p < 0.01$), *Mmp2* ($p < 0.0001$), *Mmp9* ($p < 0.01$), *Vtn* ($p < 0.0001$), *Itga5* ($p < 0.001$) e *Itgb5* ($p < 0.0001$), um perfil diferente ao do observado no grupos W48/80.

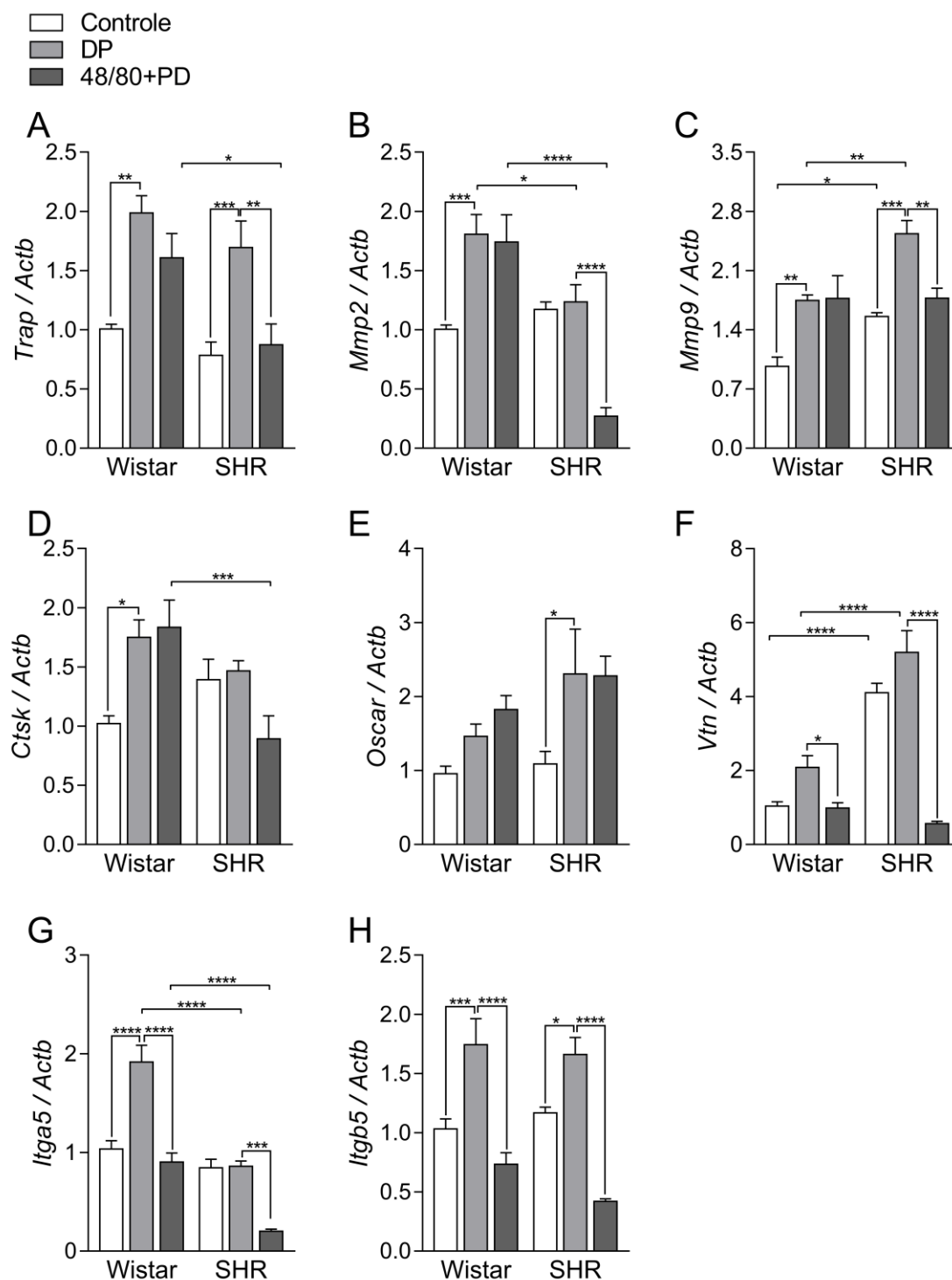


Figura 17 - Expressão gênica dos marcadores de reabsorção óssea (A) *Trap*, (B) *Mmp2*, (C) *Mmp9*, (D) *Ctsk*, (E) *Oscar*, (F) *Vtn*, (G) *Itga5*, e (H) *Itgb5* no fêmur de Wistar e SHR com doença periodontal, previamente depletados de mastócitos. Gráficos representam a média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Diferenças estatísticas expressas por * (p<0.05), ** (p<0.01), * (p<0.001) e **** (p<0.0001).**

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da depleção de mastócitos, sobre o metabolismo ósseo local, na mandíbula, e sistêmico, no fêmur, de animais normotensos (Wistar) e espontaneamente hipertensos (SHR), submetidos a doença periodontal. Nossos resultados sugerem um importante papel dos mastócitos na destruição óssea alveolar de ratos com doença periodontal, especialmente no modelo hipertenso, evidenciado principalmente pela modulação da expressão gênica de marcadores da osteoclastogênese na mandíbula e fêmur, e a produção de mediadores inflamatórios na mandíbula.

Primeiramente, avaliamos a presença de mastócitos no tecido gengival dos grupos experimentais, observando maior frequência destas células nos grupos com doença periodontal. Corroborando com nossos resultados, trabalhos já haviam associado um aumento do número mastócitos no tecido gengival com a severidade da doença periodontal em humanos, reforçando a ideia de uma importante participação células no processo patológico. No entanto, a natureza desta participação ainda não é totalmente compreendida (Batista, Rodini et al. 2005, Huang, Lu et al. 2013, Marjanovic, Andjelkovic et al. 2016). Além disso, trabalhos já sugeriram que os animais SHR apresentam uma resposta mais pronunciada destas células, como Shen, Xia et al. (2015) na bexiga, e Shiota, Rysa et al. (2003) no tecido cardíaco, ambos os trabalhos mostrando um número aumentado de mastócitos no tecido, possivelmente associado à inflamação e fibrose mais pronunciada, em relação a controles normotensos.

A partir disso, pontuamos a importância do presente trabalho, para melhor compreender o papel destas células na doença periodontal e em animais SHR,

e para tanto optamos pela metodologia de depleção sistêmica destas células a partir do tratamento prévio com o c48/80. Observamos que os grupos depletados apresentaram um número reduzido de mastócitos no tecido gengival, comparados aos grupos com doença periodontal, validando nosso modelo experimental, já utilizado em outros trabalhos, em diferentes modelos patológicos (Ribeiro, Souza-Filho et al. 1997, Oliveira, Costa et al. 2002, Carvalho, Benjamim et al. 2005, Yillar and Kucukhuseyin 2008).

Posteriormente, avaliamos as consequências da doença periodontal no osso alveolar, pela microtomografia computadorizada (microCT). Observamos uma significativa perda óssea alveolar, o que foi mais expressivo nos animais SHR. Além disso, possivelmente o aumento da produção das citocinas, tais como TNF- α e IL-6, e das quimiocinas CXCL3 e CCL20, sugerem um processo inflamatório mais exacerbado, com aumento do recrutamento de células inflamatórias, como já mostrado por Bonato, do-Amaral et al. (2012), estando também estas citocinas relacionadas a processos de perda óssea (Graves, Li et al. 2011).

Além disso, observamos uma menor expressão constitutiva de *Runx2*, *Opn*, *Bmp2* e *Opg*, e aumento constitutivo na expressão de *Trap*, *Mmp9*, *Mmp2* e *Oscar*, na mandíbula do grupo SC, comparado ao WC, dados que corroboram com a maior susceptibilidade a perda óssea no animais SHR, como já sugerido por outros autores (Leite, Redins et al. 2005, Bonato, do-Amaral et al. 2012).

Em relação a participação dos mastócitos, nossos resultados mostraram uma resposta bastante interessante, ao observamos pela microCT que os grupos depletados de mastócitos tiveram menor perda óssea alveolar, especialmente nos animais SHR, assim como houve menor expressão e

produção de mediadores inflamatórios *Tnfa*, *Il6* e *Il1b* na mandíbula. Corroborando com nossos resultados, Malcolm, Millington et al. (2016) observou menor perda óssea alveolar e menor expressão de *Tnfa*, *Il6* e *Il1b* no tecido gengival de camundongos deficiente de mastócitos (*C57BL/6 c-Kit knockout*) com doença periodontal induzida por *Porphyromonas gingivalis*, e tal evidencia reforça a hipótese de um efeito deletério destas células, visto que sua depleção levou a proteção do periodonto, assim como observamos em nossos dados.

O TNF- α tem importante papel na doença periodontal, e embora muitas células o produzam em resposta ao estímulo bacteriano, os mastócitos possuem grânulos da citocina pré-formada (Gordon and Galli 1990) e apresentam-se em número aumentado no periodonto inflamado. Além disso, sabe-se que na doença periodontal. Ainda, estudos mostram que administração de TNF- α na periodontite exacerba o recrutamento de células inflamatórias e induz a reabsorção óssea alveolar (Gaspersic, Stiblar-Martincic et al. 2003). Dessa forma, em nosso modelo experimental o TNF- α também pode apresentar um importante efeito na indução da reabsorção óssea, principalmente nos animais SDP, que possuem mais produção desta citocina.

Junto ao TNF- α , os mastócitos também produz e têm estocado nos grânulos IL-1 β e IL-6 (Steinsvoll, Helgeland et al. 2004) e trabalhos já mostraram seu aumento na doença periodontal (Chen, Chang et al. 1997, Noh, Jung et al. 2013), assim como mostrado em nossos resultados. Ambas citocinas têm importante participação na perda óssea alveolar e regulação do metabolismo ósseo. IL-1 β já foi associada a ativação direta da sinalização de RANK, assim como é capaz de induzir a expressão de *Rankl* (Kim, Jin et al. 2009, Lee, Fujikado et al. 2010, Izawa, Ishihara et al. 2014).

O papel da IL-6 entretanto, ainda é bastante discutido, visto ter participação fisiológica em processos reabsortivos, assim como de formação óssea (Franchimont, Wertz et al. 2005). Já em condições de alto *turnover* ósseo, como em processos inflamatórios, associada a outras citocinas como TNF- α e IL-1 β , seus efeitos sobre a atividade dos osteoclastos aparentam ser mais pronunciados (Kwan Tat, Padrines et al. 2004, Liu, Kirschenbaum et al. 2006). Além disso, Desai, Jung et al. (2016) mostrou que a IL-6 aumenta a proliferação e reatividade de mastócitos humanos CD34+ *in vitro* (isolados do sangue periférico). Desta forma, sugerimos ser um dos possíveis mecanismos observados nas diferenças observadas, visto que o grupo SDP apresentou maior expressão e produção de IL-6 na mandíbula, o que pode ser associado a quantidade aumentada de mastócitos no tecido gengival, assim como maior perda óssea alveolar.

Por outro lado, a IL-10 é uma das principais citocinas anti-inflamatórias, e apresenta importante papel protetor na perda óssea alveolar induzida pela doença periodontal (Al-Rasheed, Scheerens et al. 2004, Sasaki, Okamatsu et al. 2004). Nossos resultados evidenciaram maior produção de IL-10 nos grupos WDP e SDP, o que sugere um mecanismo protetor compensatório (Zhang, Chen et al. 2014). Entretanto, não observamos diferenças entre as linhagens, assim como, não foi alterada pela depleção de mastócitos, sugerindo que esta citocina, aparentemente, nas condições experimentais propostas, não esteja envolvida com as respostas observadas no presente trabalho.

Em relação a CXCL3, Wright, Chapple et al. (2011), observaram que neutrófilos estimulados com *Fusobacterium nucleatum* expressaram CXCL3 demonstrando que na periodontite ocorre produção desta quimiocina, conforme

observamos em nosso modelo experimental. Não há na literatura nenhum modelo de inflamação em animais deficientes de mastócitos que demonstre que a produção de CXCL3 é dependente de mastócitos, no entanto, é sabido que estes produzem CXCL3 (Kato, Chustz et al. 2009, Feuser, Thon et al. 2012). Outra quimiocina também encontrada em nossos estudos, foi a CCL20, também é produzida durante a doença periodontal (Hosokawa, Hosokawa et al. 2005, Panezai, Ghaffar et al. 2017) e por mastócitos (Feuser, Thon et al. 2012), no entanto, em nosso modelo experimental não observamos que sua produção foi dependente de mastócitos, apesar de estar em quantidades elevadas em animais normotensos e principalmente em hipertensos participando, dessa forma, possivelmente do processo inflamatório.

O metabolismo ósseo, principal foco deste trabalho, é regulado por fatores de transcrição, que respondem a estímulos do microambiente tecidual e regulam a expressão de diversas proteínas que mediam diretamente a formação e remodelamento do tecido (Shahi, Peymani et al. 2017). Assim, no intuito de melhor compreender a participação dos mastócitos no modelo experimental proposto, avaliamos a expressão dos principais marcadores de formação, remodelamento e reabsorção óssea.

Nossos resultados evidenciaram uma resposta interessante da *Catnb*, na doença periodontal, que teve sua expressão aumentada apenas em animais SHR, e foi reduzida nos grupos previamente depletados de mastócitos, em Wistar e SHR. Apesar da *Catnb* ser essencial na diferenciação osteogênica de células precursoras (Gaur, Lengner et al. 2005), Liu, Shi et al. (2011) mostrou em culturas de células-tronco do ligamento periodontal obtidas de tecido inflamado apresentavam uma resposta alterada de *Catnb*, onde sua expressão

elevada inibiu a via *Wnt* não canônica, resultando em uma reposta de proliferação, mas não de diferenciação óssea. Tais evidências sugerem que a reposta observada no presente trabalho pode ser relacionada ao processo inflamatório consequente da doença periodontal, principalmente nos animais SHR, que apresentam uma inflamação exacerbada e cuja participação dos mastócitos foi bastante significativa, visto que sua depleção, protegeu o tecido ósseo das consequências da doença periodontal.

Ao avaliarmos a expressão gênica dos marcadores de formação óssea na mandíbula de animais com doença periodontal, observamos algumas semelhanças e diferenças entre WDP e SDP. Ambos os grupos apresentaram redução similar da expressão de *Alp*, enzima com importante papel na mineralização de matriz, sendo um dos principais marcadores da atividade de formação óssea (Orimo 2010). Alguns trabalhos apontam a atividade de fosfatase alcalina no fluido crevicular como importante marcador de progressão da doença periodontal, com correlação clínica positiva aos índices de placa, aprofundamento do sulco gengival e de sangramento (Ishikawa and Cimasoni 1970, Malhotra, Grover et al. 2010). Grande parte dos trabalhos disponíveis na literatura avaliam este marcador em saliva e/ou fluido crevicular, e considerando que esta enzima é produzida por diferentes células, e tais determinações bioquímicas não são específicas para as diferentes isoformas, a atividade enzimática detectada em tais matrizes biológica poderiam ser a soma da atividade enzimática derivada de polimorfonucleares, microrganismos, osteoblastos e fibroblastos, e em pequena proporção, derivada do soro, como discutido por Chapple, Matthews et al. (1993). Trabalhos que avaliaram a atividade e/ou expressão de *Alp* no osso alveolar em modelos como reparo após

exodontia ou movimento dentário ortodôntico evidenciam que tal marcador mostra-se mais pronunciado em períodos tardios, caracterizados por recuperação e formação óssea (Keeling, King et al. 1993, Rodrigues, Fabris et al. 2016). Desta forma, sugerimos que o resultado obtido para a expressão gênica deste marcador no osso alveolar reflete a perda óssea alveolar e a permanência do estímulo deletério (ligadura/infecção associada), que não permite um processo natural de reversão ou reparo tecidual.

Col1a1 e *Opn* são duas proteínas da matriz óssea bastante importantes para a integridade óssea, e apresentam funções integradas. Enquanto o *Col1a1* é um dos principais componentes do arcabouço orgânico para a deposição mineral, a *Opn* media a adesão dos osteoblastos maduros, bem como a migração de seus precursores, além de engatilhar mecanismos para a osteogênese (Sodek, Ganss et al. 2000, Nudelman, Pieterse et al. 2010). A degradação de colágeno, nos tecidos moles e ósseo, é um evento característico da doença periodontal, entretanto não observamos alterações nos níveis de expressão deste marcador nos grupos WDP e SDP. Autores já reportaram o aumento da expressão de colágeno como resposta compensatória frente a degradação da matriz, entretanto a permanência da doença eventualmente leva a redução dessa expressão. Sugerimos então que o resultado observado pode ser devido ao período de análise proposto (15 dias).

A expressão de *Opn*, mostrou-se elevada na doença periodontal, em ambos os grupos WDP e SDP. *Opn* tem sido considerada um importante marcador de remodelamento ósseo, pois além de ser produzida por osteoblastos em diferenciação ou mesmo maduros, também é produzida por osteoclastos e está associada a eventos de reabsorção óssea (Oh, Oh et al. 2014). Trabalhos já

associaram o aumento desta proteína na saliva, fluido crevicular e soro com a progressão da doença periodontal em humanos (Sharma and Pradeep 2006, Hans and Mali 2012), sugerindo que tal marcador também está fortemente relacionado a progressão e severidade da doença periodontal, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

A depleção de mastócitos levou a redução da expressão de *Opn*, que além das funções ósseas tem relevante participação em respostas inflamatórias, mediando o recrutamento, adesão e ativação de leucócitos (Lund, Giachelli et al. 2009). Além disso, a *Opn* tem sido considerada como um importante marcador da atividade dos mastócitos, visto que estas células produzem *Opn*, sendo sua participação na resposta dos mastócitos bastante significativa (Nagasaka, Matsue et al. 2008). Desta forma, nossos dados apontam um importante marcador, significativamente modulado pelos mastócitos, sugerindo um possível mecanismo pelo qual estas células podem contribuir para a exacerbação do processo inflamatório e reabsorção óssea em nosso modelo.

O eixo *Opg/Rankl/Rank* regula o modelamento e remodelamento ósseo, em condições normais e patológicas. *Opg* tem função protetora contra a reabsorção excessiva, impedindo a ligação *Rankl/Rank*, que por sua vez, engatilha a formação de osteoclastos, sua ativação e desenvolvimento, assim, o equilíbrio deste eixo é crucial para a manutenção da estrutura, massa e força óssea (Boyce and Xing 2008). Ao avaliar a expressão de *Opg* e *Rankl* na gengiva e fluido crevicular de indivíduos com doença periodontal, autores já relacionaram a redução da relação *Opg/Rankl* com o processo inflamatório e severidade da perda óssea (Liu, Xu et al. 2003). Nossos resultados demonstram que na doença periodontal houve aumento significativo de *Rankl* e *Rank*, principalmente em

SDP, comparado a WDP. A maior produção de TNF- α e IL-6, e maior expressão de *Il1b* no grupo SDP, sugere maior quantidade *Rankl*, cuja produção pode ser modulada por tais citocinas (Mori, Miyamoto et al. 2011), e consequentemente maior perda óssea. Junto a este dado experimental, observamos ainda que a expressão de *Opg* no grupo WDP mostrou-se menor, enquanto ocorreu um aumento no grupo SDP, comparados aos seus respectivos controles, o que já foi observado em trabalhos prévios de nosso grupo (Do-Amaral CCF, 2012, Dissertação de mestrado). A diferença na expressão de *Opg* entre WDP e SDP aparenta ser um importante mecanismo a ser investigado, visto que este aumento observado no grupo SDP pode tratar-se de um mecanismo compensatório frente ao intenso processo inflamatório e perda óssea exacerbada, observada neste modelo.

De maneira bastante interessante, a depleção prévia de mastócitos foi capaz de reduzir a expressão dos componentes deste eixo, sugerindo importante papel dessas células na reabsorção óssea, o que pode ser explicado em partes pela menor produção de mediadores inflamatórios e quimioatraentes na mandíbula, relacionados especialmente ao estímulo osteoclastogênico e expressão de *Rank* e *Rankl* (Lesclois, Guez et al. 2001, Kroner, Kovtun et al. 2017). Além disso, os mastócitos produzem *Rankl*, e autores demonstraram que estas células têm papel importante na calcificação da placa aterosclerótica, sugerindo que sua degranulação e a liberação de *Rankl*, juntamente a proteases e ativadores de collagenase, contribui para a ruptura da placa (Saarinen, Kalkkinen et al. 1994, Ali, Lax et al. 2006). Dessa forma, sugerimos que o mesmo fenômeno esteja ocorrendo no periodonto, onde observamos a presença de

mastócitos estrategicamente localizados, e sua depleção diminui a expressão de *Rankl* e previne a perda óssea alveolar mais severa.

Trap é um marcador da atividade e maturação de osteoclastos, e uma das principais enzimas na degradação da matriz mineralizada (Boyle, Simonet et al. 2003). Como esperado e já reportado por outros autores, nossos resultados evidenciaram um aumento da expressão de *Trap* na mandíbula dos grupos com doença periodontal (Rogers, Li et al. 2007), e a depleção de mastócitos reduziu significativamente esta expressão, em Wistar e SHR. Biosse-Duplan, Baroukh et al. (2009) mostraram que o estímulo com histamina na mandíbula induziu o recrutamento e diferenciação de osteoclastos TRAP-positivos em ratos, e o tratamento com antagonistas de receptor H1 e H2 inibiu esta resposta. Observou-se também a expressão dos receptores H1 e H2 na diferenciação *in vitro* de osteoclastos. Visto que os mastócitos são grandes reservatórios de histamina, podemos sugerir que este seja um dos possíveis mecanismos envolvidos na perda óssea e aumento da expressão de *Trap* nos animais com DP, principalmente no grupo SDP, em nosso trabalho.

O processo da destruição dos tecidos periodontais, incluindo o osso alveolar é bastante complexo e envolve diversos mecanismos. Proteases de matriz extracelular têm papel importante na remodelação e manutenção do osso saudável, mas seu desequilíbrio leva degradação excessiva da matriz orgânica e desarranjo da arquitetura tecidual (Saftig, Hunziker et al. 2000, Ortega, Behonick et al. 2003). Em nosso trabalho, avaliamos a expressão das metaloproteinases de matriz *Mmp2* e *Mmp9*, bem como da *Ctsk*, uma cisteína protease, e nossos resultados mostraram diferenças interessantes nos perfis de expressão e na participação dos mastócitos entre os animais Wistar e SHR. A

doença periodontal levou a aumento da expressão de *Mmp9* e *Ctsk* em ambos os modelos, sendo maior nos animais SDP, quando comparado ao WDP. Dados da literatura também já mostraram que a doença periodontal é capaz de aumentar a expressão de *Mmp9* e *Ctsk* (Ramamurthy, Rifkin et al. 2002, Hao, Chen et al. 2015). Por outro lado, a expressão de *Mmp2* aumentou nos animais WDP, mas não apresentou nos animais SDP. Estes resultados foram observados por nosso grupo (dados não publicados) e por outros autores, que demonstraram a expressão aumentada de *Mmp2* em animais Wistar com doença periodontal (Araujo, Souza et al. 2013, de Araujo Junior, Souza et al. 2013).

Dados da literatura já associaram a participação de mastócitos na produção e ativação de proteases de matriz, diretamente através das enzimas triptase e quimase, ou indiretamente através da produção de mediadores inflamatórios (Tchougounova, Lundquist et al. 2005). Em nossos resultados observamos que a expressão de *Mmp2* em animais WDP foi dependente de mastócitos, mas não em animais SDP.

Diferentemente, a expressão de *Mmp9* não foi modulada pela depleção de mastócitos, e a expressão de *Ctsk* foi alterada apenas em animais S48/80, mas não em W48/80. Estes resultados sugerem que existem mecanismos diferentes entre os animais Wistar e SHR, assim como a participação diferencial dos mastócitos entre estes animais, em partes devido a presença de diferentes mediadores inflamatórios no local da lesão e, conseqüentemente, ocasionando uma menor destruição alveolar nos grupos depletados de mastócitos, visto que a inibição destas proteases reduz o processo inflamatório e a destruição alveolar, corroborando com a hipótese de um papel deletério destas células na doença periodontal (Beltran, CT., Chen, Gao et al. 2016).

Oscar (*Osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor*) é um receptor tipo IgG e recentemente tem sido discutido como importante mediador osteoimunológico, com função co-estimulatória na diferenciação de osteoclastos pela ativação do fator de transcrição NFAT (Nemeth, Schoppet et al. 2011), e já foi associado a diferentes condições de perda óssea, como por exemplo, na deficiência de estrógeno em mulheres menopausadas (Kim, Koh et al. 2005), e artrite reumatoide (Andersson, Lundberg et al. 2007, Herman, Muller et al. 2008). Neste presente trabalho, avaliamos pela primeira vez sua expressão em mandíbula de animais com doença periodontal, onde observamos um aumento bastante expressivo, especialmente em SDP, comparado a WDP, suportando a hipótese de que a exacerbação da perda óssea em animais hipertensos pode ser pelo menos em parte devido a elevada expressão desta molécula. Entretanto, a depleção de mastócitos não levou a alterações nesta resposta sugerindo que a expressão de *Oscar* não é modulada por estas células. Este dado pode ser um importante mecanismo a ser investigado, visto que existe uma marcada diferença entre os animais Wistar e SHR, apesar de aparentemente não ser modulada pelos mastócitos.

A expressão de vitronectina (*Vtn*) e das subunidades de integrina αV e $\beta 5$ (*ItgaV* e *Itgb5*), receptores de *Vtn*, também foram avaliados no modelo proposto. Estas proteínas medeiam adesão, migração e sinalização celular em diferentes células (Larjava, Koivisto et al. 2014). Nossos resultados mostraram aumento de expressão deste alvos no grupo SDP, enquanto no grupo WDP houve apenas aumento de *Itga5* e *Itgb5*, e a depleção de mastócitos foi capaz de reduzir suas expressões em ambas os animais, sugerindo ser modulado por mastócitos. Lakkakorpi, Horton et al. (1991) evidenciou um importante papel da *Vtn* na

regulação dos osteoclastos, que apesar de não estar presente na zona de adesão da matriz óssea, é expressa em todo restante da membrana, com possível papel na permanência e migração dos osteoclastos. Não há na literatura estudos funcionais da *Vtn* na perda óssea alveolar, mas Steffensen, Duong et al. (1992) já caracterizou sua presença em tecidos periodontais (gengiva marginal, ligamento periodontal, endósteo e periósteo), o que nos permite sugerir, uma possível participação da *Vtn* na doença periodontal, sendo uma das responsáveis pela diferença de resposta entre os animais Wistar e SHR, além de ser modulada pelos mastócitos.

As integrinas, por sua vez, constituem uma família de proteína heterodiméricas (subunidade α e β), que medeiam a adesão de células à matriz extracelular, e em alguns casos interação célula-célula (Barczyk, Carracedo et al. 2010). Trabalhos já demonstraram o papel de diferentes moléculas de adesão em tecidos periodontais, como Ghannad, Nica et al. (2008) que demonstrou papel protetor da integrina $\alpha 5\beta 6$, ativada por TGF- $\beta 1$, no epitélio gengival, e Barczyk, Olsen et al. (2009) que evidenciou o papel da integrina $\alpha 11\beta 1$ no remodelamento de matriz colágena em células do ligamento periodontal *in vitro*.

Não diretamente no osso alveolar, objetivo deste trabalho, mas em outros modelos, as integrinas têm se mostrado importantes na fisiologia óssea, como descrito por El Azreq, Arseneault et al. (2015), em relação ao receptor de IL-7 e a integrina $\alpha 2\beta 1$ na atividade de osteoclastos *in vitro* e perda óssea *in vivo*, induzida por resposta inflamatória do tipo Th17. Outras referências da literatura também discutem sua participação no remodelamento de matriz extracelular em outros tecidos, como Slany, Haudek-Prinz et al. (2014) que evidenciou a possível participação da integrina $\alpha 5\beta 5$ em células fibroblastóides da medula óssea de

pacientes com mieloma múltiplo. Trabalhos com abordagem mecanicista relacionando as subunidade das integrinas avaliadas no presente estudo (*Itga5* e *Itgb5*) ainda são escassos, de modo que a exata função dessas proteínas ainda não é totalmente conhecida, em parte pela ausência de modelos *knockouts*, como citado por Larjava, Koivisto et al. (2014) visto a letalidade/incompatibilidade com desenvolvimento de alguns modelos, e entre os disponíveis, poucos mostraram fenótipos periodontais, entretanto as evidências supracitadas sugerem sua participação na patologia periodontal, especificamente na destruição óssea alveolar.

Além das consequências locais de doença periodontal, também estudamos os efeitos sistêmicos, nas condições propostas. Anbinder, Moraes et al. (2016) já mostrou claramente que a doença periodontal afeta o metabolismo ósseo sistêmico, em camundongos fêmeas, onde a doença periodontal sozinha não foi capaz de afetar o fêmur, mas exacerbou significativamente a perda óssea sistêmica induzida pela ovariectomia, porém os mecanismos relacionados não foram completamente elucidados. De maneira similar, nossos resultados demonstraram que a doença periodontal, nos animais Wistar e SHR não levou a alterações significativas na arquitetura trabecular e cortical do fêmur, entretanto, observamos alterações no perfil de expressão gênica de diversos marcadores ósseos. Embora existam evidências de efeitos sistêmicos da doença periodontal, até o momento, nenhum estudo prévio examinou o perfil de expressão de genes relacionados ao metabolismo ósseo no fêmur de animais SHR com doença periodontal, nem a influência dos mastócitos, pontuando a importância deste trabalho.

Nossos resultados mostraram uma resposta muito interessante sobre os efeitos da doença periodontal no fêmur, sugerindo um aumento na atividade óssea, enquanto a depleção de mastócitos levou ao resultado oposto. No grupo WDP, observamos um aumento da expressão de *Runx2* no fêmur, enquanto no grupo SDP não houve diferença, assim como em relação a expressão de *Osx* e *Catnb*, que não sofreram alteração em nenhum animal. Conforme descrito anteriormente, o fator de transcrição ósseo que media a ativação dos osteoblastos na mandíbula, local onde ocorre o processo inflamatório, é a *Catnb*, e diferentemente no fêmur, longe do local da lesão, *Runx2* é o fator envolvido, mostrando mecanismos de ativação diferente a nível sistêmico. Como avaliamos a expressão 15 dias após a doença periodontal, a *Catnb* está elevada na mandíbula de SDP, possivelmente por que os osteoblastos já se encontram maduros, diferentemente da maturação sistêmica. Além disso, algumas vias de sinalização intracelulares podem inibir negativamente *Runx2* (Vimalraj, Arumugam et al. 2015), como observado na mandíbula, no entanto, são necessário estudos mais aprofundados para identificar tais vias em nosso modelo, mas sabemos que este mecanismo no fêmur é modulado pela presença dos mastócitos.

Com relação aos marcadores da formação óssea, observamos também uma diferença entre a mandíbula e o fêmur. Enquanto na resposta local (mandíbula) apenas *Opn* estava elevada, a nível sistêmico observamos que o fêmur no grupo WDP teve maior expressão de *Col1a1*, *Opn*, *Ocn*, *Bsp* e *Bmp2*. Por outro lado, o fêmur no grupo SDP expressou apenas *Opn*, mais uma vez demonstrando a diferença no mecanismo envolvido na resposta local e sistêmica, principalmente em relação ao SDP. A *Opn* tem sido identificada como

uma citocina chave envolvida na inflamação e reparo tecidual, visto que é produzida por uma grande variedade de células imune e não imune modulando diferentes funções.

Como observado anteriormente em nosso laboratório, animais SDP apresentam uma produção aumentada de *Opn* na mandíbula, possivelmente por conta de uma inflamatória mais acentuada (Bonato, do-Amaral et al. 2012). No fêmur, também podemos observar que este aumento, e em ambos os casos, foi modulado pela presença de mastócitos. Na realidade, o processo inflamatório induzido pela doença periodontal aumentou consideravelmente os marcadores de formação óssea no fêmur de animais WDP, possivelmente pela própria diferença em relação ao nível de inflamação ser menor em animais normotensos do que em animais hipertensos.

Os marcadores de reabsorção óssea também seguiram este padrão de resposta, no fêmur com alguns alvos se comportando de modo diferente da mandíbula. Observamos que *Trap*, *Mmp2*, *Mmp9* e *Vtn*, mantiveram o mesmo padrão de resposta no fêmur após a doença periodontal induzida na mandíbula, em animais normotensos e hipertensos. No entanto, *Ctsk* e *Itga5* aumentaram no fêmur de WDP e *Oscar* aumentou no fêmur de SDP. Esses resultados sugerem que a via de estimulação sistêmica da reabsorção óssea entre os animais é diferente. Confirmando nossa hipótese, observamos que no fêmur foram altamente expressos *Opg* e *Rankl* e em menor expressão *Rank*, sugerindo que a inflamação local causa uma reabsorção óssea menor a nível sistêmico. Futuros estudos devem ser realizados para identificarmos os mecanismos envolvido. No entanto, podemos sugerir que possivelmente, a resposta observada em animais com doença periodontal poderia ser um mecanismo

compensatório, levando a um aumento do *turnover* ósseo desencadeado por uma inflamação sistêmica de baixa intensidade, visto que a detecção de mediadores inflamatórios no fêmur não foi possível, pela baixa quantidade dos mesmos (Moutsopoulos and Madianos 2006). Ainda assim, a participação dos mastócitos nesta modulação parece ser bastante significativa na expressão dos marcadores ósseos, pois sua depleção diminuiu a expressão dos marcadores ósseos.

Como propusemos, outras doenças inflamatórias crônicas estão associadas à perda óssea sistêmica e, em alguns estudos, parece ser mediada por alterações da dinâmica da remodelação óssea, entretanto os efeitos sistêmicos levariam mais tempo para apresentar alterações na arquitetura óssea (Goldring 2003, Moschen, Kaser et al. 2005). Devido à característica de baixo grau da inflamação induzida pela doença periodontal, isto levaria a uma leve reabsorção óssea que deve resultar, secundariamente, em uma estimulação da formação óssea devido ao acoplamento normal da dinâmica de remodelação (acoplamento osteoclasto-osteoblasto). A persistência do estado inflamatório e/ou a associação com uma desordem óssea, eventualmente, culminariam com uma perda óssea sistêmica significativa, resultante de desequilíbrios permanentes/duradouros e formação óssea relativamente inadequada em relação a taxa de reabsorção (Hardy and Cooper 2009).

A deficiência de mastócitos tem sido associada a estados de baixa remodelação, enquanto seu excesso está associado à perda óssea acelerada (Silberstein, Melnick et al. 1991, Chiappetta and Gruber 2006). Este pressuposto torna-se evidente no nosso estudo, onde observamos que a doença periodontal aumento a expressão dos componentes do eixo *Opg/Rankl/Rank* no fêmur,

enquanto a depleção de mastócitos foi capaz de reduzi-la, sendo mais significativo no SHR. Esta resposta poderia sugerir um estado de remodelação menos dinâmico no fêmures do grupo S48/80. Outras análises são necessárias para entender melhor esses efeitos e confirmar nossa hipótese, mas nossos resultados certamente demonstram um papel importante dos mastócitos na dinâmica óssea, em partes, modulando a expressão gênica de diferentes marcadores.

Tomados com em conjunto, nossos resultados trazem evidências de alterações na formação e remodelação óssea de animais SHR com doença periodontal e a participação dos mastócitos, que apresentando um papel expressivo no microambiente ósseo. Além disso, mostramos no modelo proposto, as consequências ósseas sistêmicas (fêmur), sugerindo um importante papel destas células na modulação da dinâmica óssea.

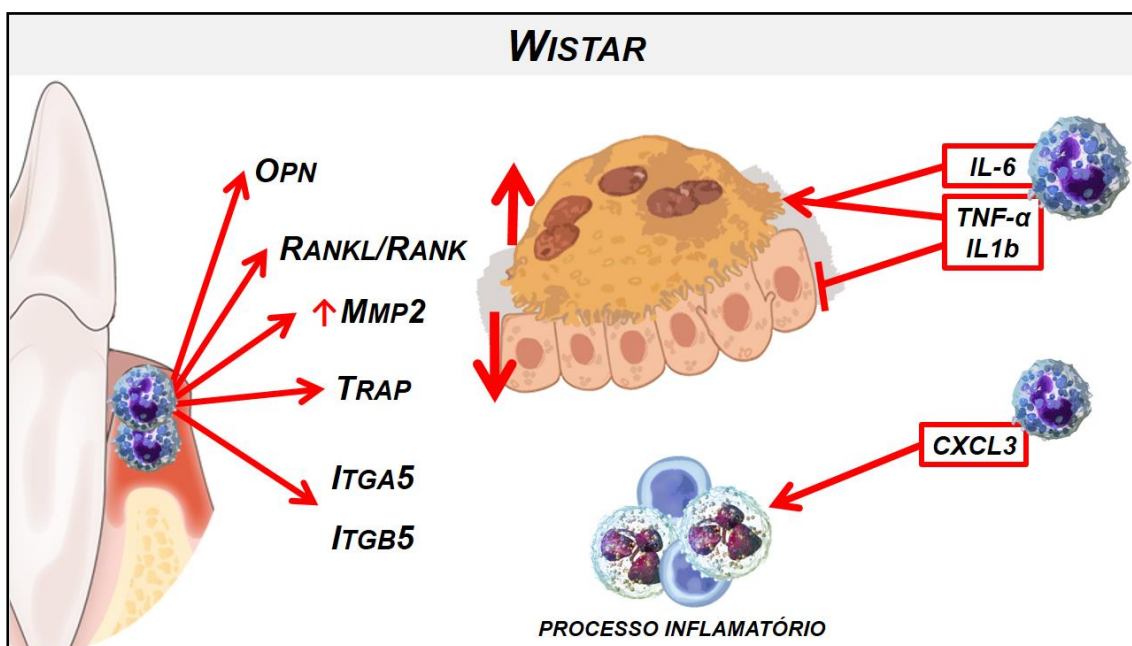


Figura 18 - Esquema do papel dos mastócitos no metabolismo ósseo local (mandíbula) de animais Wistar com doença periodontal

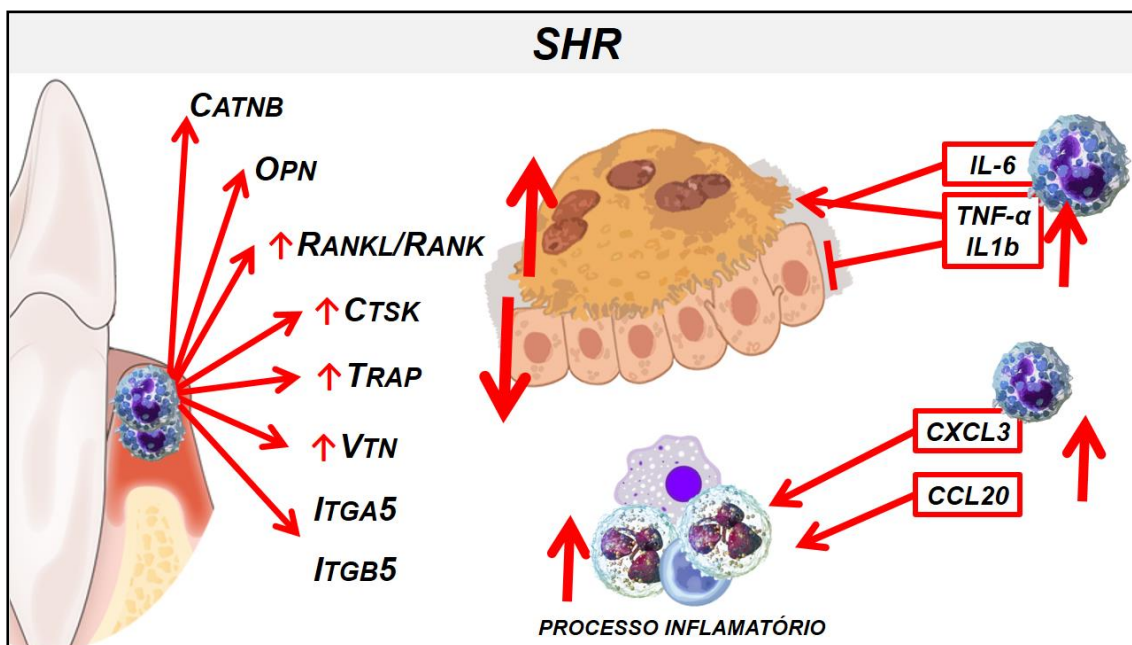


Figura 19 - Esquema do papel dos mastócitos no metabolismo ósseo local (mandíbula) de animais SHR com doença periodontal

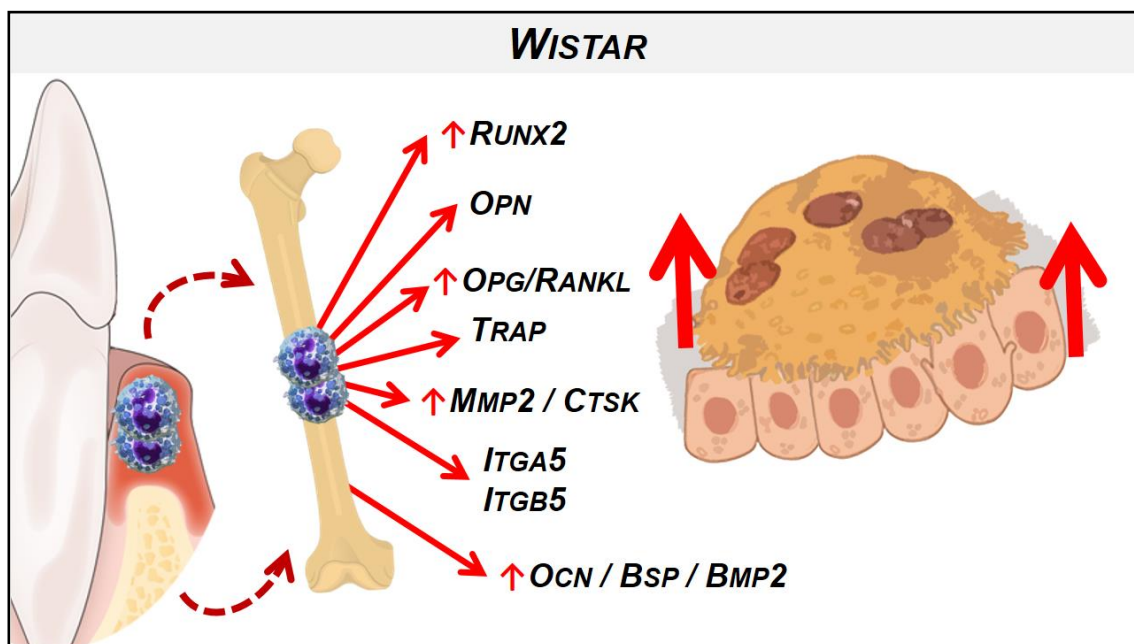


Figura 20 - Esquema do papel dos mastócitos no metabolismo ósseo sistêmico (fêmur) de animais Wistar com doença periodontal

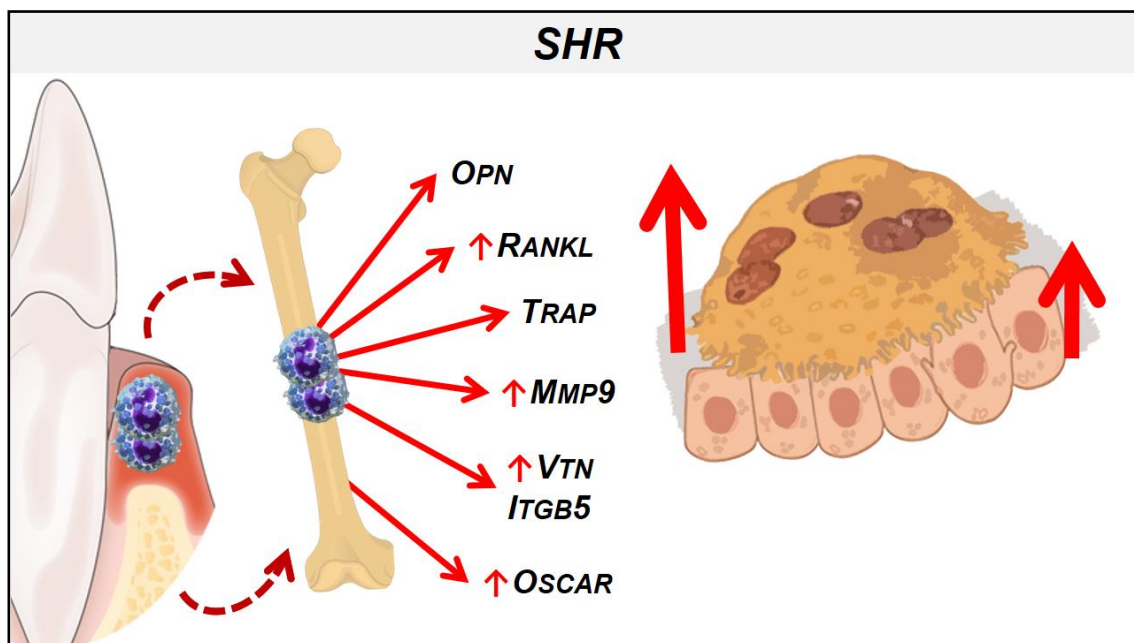


Figura 21 - Esquema do papel dos mastócitos no metabolismo ósseo sistêmico (fêmur) de animais SHR com doença periodontal

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A partir de nossos resultados, mostramos pela primeira vez que mastócitos modulam alterações no metabolismo ósseo **local** e **sistêmico** induzidas pela doença periodontal, em animais normotensos e **principalmente em hipertensos**, sendo a modulação sistêmica mediada por mecanismos diferentes da resposta local.

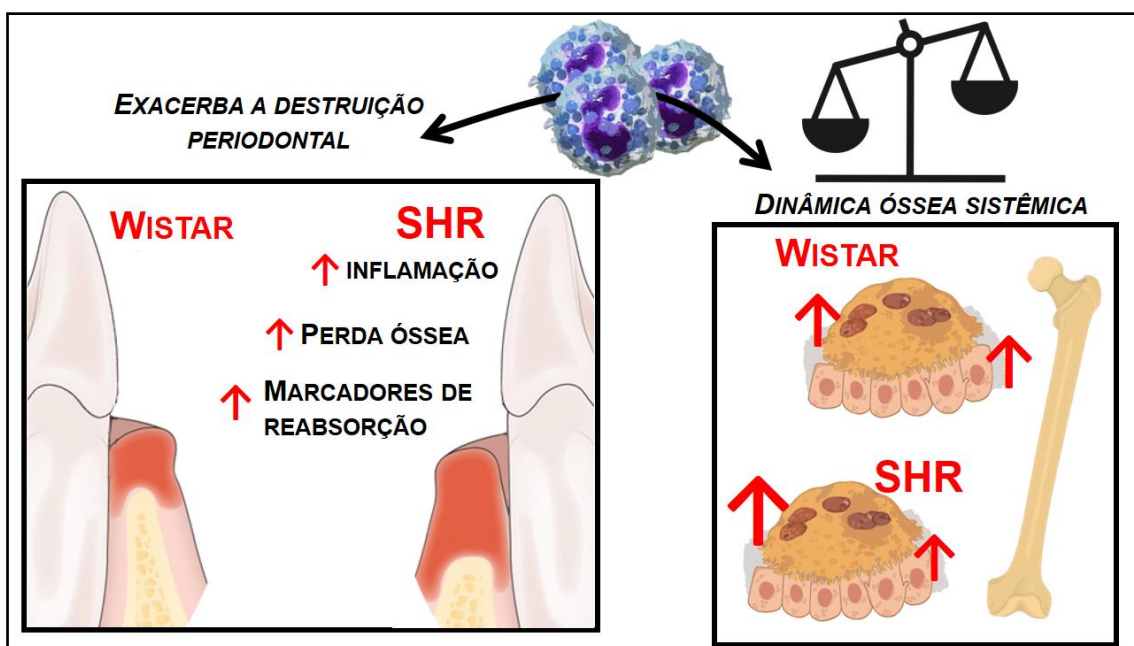


Figura 22 - Esquema das conclusões do trabalho

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afghani, A. and M. I. Goran (2007). "Lower bone mineral content in hypertensive compared with normotensive overweight Latino children and adolescents." Am J Hypertens **20**(2): 190-196.

Afghani, A. and C. A. Johnson (2006). "Resting blood pressure and bone mineral content are inversely related in overweight and obese Hispanic women." Am J Hypertens **19**(3): 286-292.

Al-Hezaimi, K., F. Javed, T. S. Ali, M. Al-Askar and A. Al-Rasheed (2012). "Rapidly progressive periodontal disease associated with human immunodeficiency virus." J Coll Physicians Surg Pak **22**(3): 186-188.

Al-Rasheed, A., H. Scheerens, A. K. Srivastava, D. M. Rennick and D. N. Tatakis (2004). "Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10: late onset." J Periodontol Res **39**(3): 194-198.

Alaluusua, S., S. Kivitie-Kallio, J. Wolf, M. L. Haavio, S. Asikainen and S. Pirinen (1997). "Periodontal findings in Cohen syndrome with chronic neutropenia." J Periodontol **68**(5): 473-478.

Ali, A. S., A. S. Lax, M. Liljestrom, I. Paakkari, N. Ashammakhi, P. T. Kovanen and Y. T. Kontinen (2006). "Mast cells in atherosclerosis as a source of the cytokine RANKL." Clin Chem Lab Med **44**(5): 672-674.

Anbinder, A. L., R. M. Moraes, G. M. Lima, F. E. Oliveira, D. R. Campos, R. D. Rossoni, L. D. Oliveira, J. C. Junqueira, Y. Ma and F. Elefteriou (2016). "Periodontal disease exacerbates systemic ovariectomy-induced bone loss in mice." Bone **83**: 241-247.

Andersson, M. K., P. Lundberg, A. Ohlin, M. J. Perry, A. Lie, A. Stark and U. H. Lerner (2007). "Effects on osteoclast and osteoblast activities in cultured mouse calvarial bones by synovial fluids from patients with a loose joint prosthesis and from osteoarthritis patients." Arthritis Res Ther **9**(1): R18.

Araujo, A. A., T. O. Souza, L. M. Moura, G. A. Brito, K. S. Aragao, L. S. Araujo, C. A. Medeiros, M. S. Alves and R. F. Araujo, Jr. (2013). "Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF-alpha, down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model." J Clin Periodontol **40**(12): 1104-1111.

Bailleul-Forestier, I., J. Monod-Broca, M. Benkerrou, F. Mora and B. Picard (2008). "Generalized periodontitis associated with Chediak-Higashi syndrome." J Periodontol **79**(7): 1263-1270.

Barbato, L., E. Francioni, M. Bianchi, E. Mascitelli, L. B. Marco and D. P. Tonelli (2015). "Periodontitis and bone metabolism." Clin Cases Miner Bone Metab **12**(2): 174-177.

Barczyk, M., S. Carracedo and D. Gullberg (2010). "Integrins." Cell Tissue Res **339**(1): 269-280.

Barczyk, M. M., L. H. Olsen, P. da Franca, B. G. Loos, K. Mustafa, D. Gullberg and A. I. Bolstad (2009). "A role for alpha11beta1 integrin in the human periodontal ligament." J Dent Res **88**(7): 621-626.

- Barnett, M. L. (1974). "The fine structure of human connective tissue mast cells in periodontal disease." J Periodontal Res **9**(2): 84-91.
- Bastos, M. F., F. V. Brilhante, J. P. Bezerra, C. A. Silva and P. M. Duarte (2010). "Trabecular bone area and bone healing in spontaneously hypertensive rats: a histometric study." Braz Oral Res **24**(2): 170-176.
- Batchelor, P. (2014). "Is periodontal disease a public health problem?" Br Dent J **217**(8): 405-409.
- Batista, A. C., C. O. Rodini and V. S. Lara (2005). "Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease." Oral Dis **11**(4): 249-254.
- Beausejour, C. (2007). "Bone marrow-derived cells: the influence of aging and cellular senescence." Handb Exp Pharmacol(180): 67-88.
- Beltran, C. T. (2016). Diabetes promove potencialização da reabsorção óssea alveolar e causa desequilíbrio entre MMPs e colágeno em camundongos com doença periodontal experimental, Faculdade de Odontologia de Araçatuba.
- Berglundh, T., L. Persson and B. Klinge (2002). "A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years." J Clin Periodontol **29 Suppl 3**: 197-212; discussion 232-193.
- Bergstrom, J. (2004). "Tobacco smoking and chronic destructive periodontal disease." Odontology **92**(1): 1-8.
- Biosse-Duplan, M., B. Baroukh, M. Dy, M. C. de Vernejoul and J. L. Saffar (2009). "Histamine promotes osteoclastogenesis through the differential expression of histamine receptors on osteoclasts and osteoblasts." Am J Pathol **174**(4): 1426-1434.
- Bonato, C. F., C. C. do-Amaral, L. Belini, L. M. Salzedas and S. H. Oliveira (2012). "Hypertension favors the inflammatory process in rats with experimentally induced periodontitis." J Periodontal Res **47**(6): 783-792.
- Bonfim Mde, L., F. F. Mattos, E. Ferreira e Ferreira, A. C. Campos and A. M. Vargas (2013). "Social determinants of health and periodontal disease in Brazilian adults: a cross-sectional study." BMC Oral Health **13**: 22.
- Boos, C. J. and G. Y. Lip (2006). "Is hypertension an inflammatory process?" Curr Pharm Des **12**(13): 1623-1635.
- Bouxsein, M. L., S. K. Boyd, B. A. Christiansen, R. E. Guldberg, K. J. Jepsen and R. Muller (2010). "Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography." J Bone Miner Res **25**(7): 1468-1486.
- Boyce, B. F. and L. Xing (2008). "Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling." Arch Biochem Biophys **473**(2): 139-146.
- Boyle, W. J., W. S. Simonet and D. L. Lacey (2003). "Osteoclast differentiation and activation." Nature **423**(6937): 337-342.
- Brito, L. C., S. DalBo, T. M. Striechen, J. M. Farias, L. R. Olchanheski, Jr., R. T. Mendes, J. C. Velloso, G. M. Favero, R. Sordi, J. Assreuy, F. A. Santos and D. Fernandes (2013).

"Experimental periodontitis promotes transient vascular inflammation and endothelial dysfunction." Arch Oral Biol **58**(9): 1187-1198.

Brock, G. R., C. J. Butterworth, J. B. Matthews and I. L. Chapple (2004). "Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health." J Clin Periodontol **31**(7): 515-521.

Bullon, P., M. D. Cordero, J. L. Quiles, J. M. Morillo, M. del Carmen Ramirez-Tortosa and M. Battino (2011). "Mitochondrial dysfunction promoted by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide as a possible link between cardiovascular disease and periodontitis." Free Radic Biol Med **50**(10): 1336-1343.

Caillon, A. and E. L. Schiffrin (2016). "Role of Inflammation and Immunity in Hypertension: Recent Epidemiological, Laboratory, and Clinical Evidence." Curr Hypertens Rep **18**(3): 21.

Cappuccio, F. P., R. Kalaitzidis, S. Dunelclift and J. B. Eastwood (2000). "Unravelling the links between calcium excretion, salt intake, hypertension, kidney stones and bone metabolism." J Nephrol **13**(3): 169-177.

Carranza, F. A., Jr. and R. L. Cabrini (1955). "Mast cells in human gingiva." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **8**(10): 1093-1099.

Carretero, O. A. and S. Oparil (2000). "Essential hypertension. Part I: definition and etiology." Circulation **101**(3): 329-335.

Carvalho, M., C. Benjamim, F. Santos, S. Ferreira and F. Cunha (2005). "Effect of mast cells depletion on the failure of neutrophil migration during sepsis." Eur J Pharmacol **525**(1-3): 161-169.

Cashman, K. D. (2007). "Diet, nutrition, and bone health." J Nutr **137**(11 Suppl): 2507S-2512S.

Cekici, A., A. Kantarci, H. Hasturk and T. E. Van Dyke (2014). "Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease." Periodontol 2000 **64**(1): 57-80.

Chapple, I. L. (2014). "Time to take periodontitis seriously." BMJ **348**: g2645.

Chapple, I. L., R. Genco and E. F. P. A. A. P. w. Working group 2 of joint (2013). "Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases." J Clin Periodontol **40** Suppl 14: S106-112.

Chapple, I. L., J. B. Matthews, G. H. Thorpe, H. D. Glenwright, J. M. Smith and M. S. Saxby (1993). "A new ultrasensitive chemiluminescent assay for the site-specific quantification of alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid." J Periodontal Res **28**(4): 266-273.

Chen, C. C., K. L. Chang, J. F. Huang, J. S. Huang and C. C. Tsai (1997). "Correlation of interleukin-1 beta, interleukin-6, and periodontitis." Kaohsiung J Med Sci **13**(10): 609-617.

Chen, W., B. Gao, L. Hao, G. Zhu, J. Jules, M. J. MacDougall, J. Wang, X. Han, X. Zhou and Y. P. Li (2016). "The silencing of cathepsin K used in gene therapy for periodontal disease reveals the role of cathepsin K in chronic infection and inflammation." J Periodontal Res **51**(5): 647-660.

Chiappetta, N. and B. Gruber (2006). "The role of mast cells in osteoporosis." Semin Arthritis Rheum **36**(1): 32-36.

Cho, M. I. and P. R. Garant (2000). "Development and general structure of the periodontium." Periodontol 2000 **24**: 9-27.

da Silva, E. Z., M. C. Jamur and C. Oliver (2014). "Mast cell function: a new vision of an old cell." J Histochem Cytochem **62**(10): 698-738.

DALYs, G. B. D. and H. Collaborators (2016). "Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015." Lancet **388**(10053): 1603-1658.

de Araujo Junior, R. F., T. O. Souza, C. A. de Medeiros, L. B. de Souza, L. Freitas Mde, H. F. de Lucena, M. do Socorro Costa Feitosa Alves and A. A. de Araujo (2013). "Carvedilol decrease IL-1beta and TNF-alpha, inhibits MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL expression, and up-regulates OPG in a rat model of periodontitis." PLoS One **8**(7): e66391.

Desai, A., M. Y. Jung, A. Olivera, A. M. Gilfillan, C. Prussin, A. S. Kirshenbaum, M. A. Beaven and D. D. Metcalfe (2016). "IL-6 promotes an increase in human mast cell numbers and reactivity through suppression of suppressor of cytokine signaling 3." J Allergy Clin Immunol **137**(6): 1863-1871 e1866.

Donos, N., L. Laurell and N. Mardas (2012). "Hierarchical decisions on teeth vs. implants in the periodontitis-susceptible patient: the modern dilemma." Periodontol 2000 **59**(1): 89-110.

El Azreq, M. A., C. Arseneault, M. Boisvert, N. Page, I. Allaey, P. E. Poubelle, P. A. Tessier and F. Aoudjit (2015). "Cooperation between IL-7 Receptor and Integrin alpha2beta1 (CD49b) Drives Th17-Mediated Bone Loss." J Immunol **195**(9): 4198-4209.

Feng, X. and J. M. McDonald (2011). "Disorders of bone remodeling." Annu Rev Pathol **6**: 121-145.

Feuser, K., K. P. Thon, S. C. Bischoff and A. Lorentz (2012). "Human intestinal mast cells are a potent source of multiple chemokines." Cytokine **58**(2): 178-185.

Forwood, M. R. and D. B. Burr (1993). "Physical activity and bone mass: exercises in futility?" Bone Miner **21**(2): 89-112.

Frame, B. and R. K. Nixon (1968). "Bone-marrow mast cells in osteoporosis of aging." N Engl J Med **279**(12): 626-630.

Franchimont, N., S. Wertz and M. Malaise (2005). "Interleukin-6: An osteotropic factor influencing bone formation?" Bone **37**(5): 601-606.

Gaspersic, R., D. Stiblar-Martincic, J. Osredkar and U. Skaleric (2003). "Influence of subcutaneous administration of recombinant TNF-alpha on ligature-induced periodontitis in rats." J Periodontal Res **38**(2): 198-203.

Gaur, T., C. J. Lengner, H. Hovhannisyan, R. A. Bhat, P. V. Bodine, B. S. Komm, A. Javed, A. J. van Wijnen, J. L. Stein, G. S. Stein and J. B. Lian (2005). "Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression." J Biol Chem **280**(39): 33132-33140.

Ghannad, F., D. Nica, M. I. Fulle, D. Grenier, E. E. Putnins, S. Johnston, A. Eslami, L. Koivisto, G. Jiang, M. D. McKee, L. Hakkinen and H. Larjava (2008). "Absence of alphavbeta6 integrin is linked to initiation and progression of periodontal disease." Am J Pathol **172**(5): 1271-1286.

Ginaldi, L., M. C. Di Benedetto and M. De Martinis (2005). "Osteoporosis, inflammation and ageing." Immun Ageing **2**: 14.

Goldring, S. R. (2003). "Inflammatory mediators as essential elements in bone remodeling." Calcif Tissue Int **73**(2): 97-100.

Gordon, J. R. and S. J. Galli (1990). "Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin." Nature **346**(6281): 274-276.

Graves, D. T., J. Li and D. L. Cochran (2011). "Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss." J Dent Res **90**(2): 143-153.

Hans, S. and A. M. Mali (2012). "Estimation and comparison of osteopontin levels in plasma in subjects with healthy periodontium and generalized chronic periodontitis and its assessment after scaling and root planing." J Indian Soc Periodontol **16**(3): 354-357.

Hao, L., J. Chen, Z. Zhu, M. S. Reddy, J. D. Mountz, W. Chen and Y. P. Li (2015). "Odanacatib, A Cathepsin K-Specific Inhibitor, Inhibits Inflammation and Bone Loss Caused by Periodontal Diseases." J Periodontol **86**(8): 972-983.

Hardy, R. and M. S. Cooper (2009). "Bone loss in inflammatory disorders." J Endocrinol **201**(3): 309-320.

Harrison, D. G., T. J. Guzik, H. E. Lob, M. S. Madhur, P. J. Marvar, S. R. Thabet, A. Vinh and C. M. Weyand (2011). "Inflammation, immunity, and hypertension." Hypertension **57**(2): 132-140.

Harrison, D. G., P. J. Marvar and J. M. Titze (2012). "Vascular inflammatory cells in hypertension." Front Physiol **3**: 128.

Hasan, A. and R. M. Palmer (2014). "A clinical guide to periodontology: pathology of periodontal disease." Br Dent J **216**(8): 457-461.

Herman, S., R. B. Muller, G. Kronke, J. Zwerina, K. Redlich, A. J. Hueber, H. Gelse, E. Neumann, U. Muller-Ladner and G. Schett (2008). "Induction of osteoclast-associated receptor, a key osteoclast costimulation molecule, in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **58**(10): 3041-3050.

Higashi, Y., C. Goto, T. Hidaka, J. Soga, S. Nakamura, Y. Fujii, T. Hata, N. Idei, N. Fujimura, K. Chayama, Y. Kihara and A. Taguchi (2009). "Oral infection-inflammatory pathway, periodontitis, is a risk factor for endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease." Atherosclerosis **206**(2): 604-610.

Hosokawa, Y., I. Hosokawa, K. Ozaki, H. Nakae and T. Matsuo (2005). "Increase of CCL20 expression by human gingival fibroblasts upon stimulation with cytokines and bacterial endotoxin." Clin Exp Immunol **142**(2): 285-291.

Huang, S., F. Lu, Y. Chen, B. Huang and M. Liu (2013). "Mast cell degranulation in human periodontitis." J Periodontol **84**(2): 248-255.

Huja, S. S., S. A. Fernandez, K. J. Hill and Y. Li (2006). "Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **288**(12): 1243-1249.

Hunter, W. (1900). "Oral Sepsis as a Cause of Disease." Br Med J **2**(2065): 215-216.

Hunter, W. (1911). "An Address ON THE RÔLE OF SEPSIS AND OF ANTISEPSIS IN MEDICINE." The Lancet **177**(4559): 79-86.

Inoue, T., A. Moriya, K. Goto, T. Tanaka and M. Inazu (1995). "What is the difference of bone growth in SHR and SD rats?" Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl **22**(1): S242-243.

Ishikawa, I. and G. Cimasoni (1970). "Alkaline phosphatase in human gingival fluid and its relation to periodontitis." Arch Oral Biol **15**(12): 1401-1404.

Izawa, A., Y. Ishihara, H. Mizutani, S. Kobayashi, H. Goto, E. Okabe, H. Takeda, Y. Ozawa, Y. Kamiya, Y. Sugita, K. Kubo, H. Kamei, T. Kikuchi, A. Mitani, J. Hayashi, T. Nishihara, H. Maeda and T. Noguchi (2014). "Inflammatory bone loss in experimental periodontitis induced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in interleukin-1 receptor antagonist knockout mice." Infect Immun **82**(5): 1904-1913.

Kapferer-Seebacher, I., M. Pepin, R. Werner, T. J. Aitman, A. Nordgren, H. Stoiber, N. Thielens, C. Gaboriaud, A. Amberger, A. Schossig, R. Gruber, C. Giunta, M. Bamshad, E. Bjorck, C. Chen, D. Chitayat, M. Dorschner, M. Schmitt-Egenolf, C. J. Hale, D. Hanna, H. C. Hennies, I. Heiss-Kisielewsky, A. Lindstrand, P. Lundberg, A. L. Mitchell, D. A. Nickerson, E. Reinstein, M. Rohrbach, N. Romani, M. Schmuth, R. Silver, F. Taylan, A. Vandersteen, J. Vandrovcova, R. Weerakkody, M. Yang, F. M. Pope, E. D. S. C. Molecular Basis of Periodontal, P. H. Byers and J. Zschocke (2016). "Periodontal Ehlers-Danlos Syndrome Is Caused by Mutations in C1R and C1S, which Encode Subcomponents C1r and C1s of Complement." Am J Hum Genet **99**(5): 1005-1014.

Kassem, M. and P. J. Marie (2011). "Senescence-associated intrinsic mechanisms of osteoblast dysfunctions." Aging Cell **10**(2): 191-197.

Kato, A., R. T. Chustz, T. Ogasawara, M. Kulka, H. Saito, R. P. Schleimer and K. Matsumoto (2009). "Dexamethasone and FK506 inhibit expression of distinct subsets of chemokines in human mast cells." J Immunol **182**(11): 7233-7243.

Keeling, S. D., G. J. King, E. A. McCoy and M. Valdez (1993). "Serum and alveolar bone phosphatase changes reflect bone turnover during orthodontic tooth movement." Am J Orthod Dentofacial Orthop **103**(4): 320-326.

Kim, G. S., J. M. Koh, J. S. Chang, B. L. Park, L. H. Kim, E. K. Park, S. Y. Kim and H. D. Shin (2005). "Association of the OSCAR promoter polymorphism with BMD in postmenopausal women." J Bone Miner Res **20**(8): 1342-1348.

Kim, J. and S. Amar (2006). "Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship." Odontology **94**(1): 10-21.

Kim, J. H., H. M. Jin, K. Kim, I. Song, B. U. Youn, K. Matsuo and N. Kim (2009). "The mechanism of osteoclast differentiation induced by IL-1." J Immunol **183**(3): 1862-1870.

Kinane, D. F., P. G. Stathopoulou and P. N. Papapanou (2017). "Periodontal diseases." Nat Rev Dis Primers **3**: 17038.

Koziel, J., P. Mydel and J. Potempa (2014). "The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: an updated review." Curr Rheumatol Rep **16**(3): 408.

Kroner, J., A. Kovtun, J. Kemmler, J. J. Messmann, G. Strauss, S. Seitz, T. Schinke, M. Amling, J. Kotrba, J. Froebel, J. Dudeck, A. Dudeck and A. Ignatius (2017). "Mast Cells Are Critical Regulators of Bone Fracture-Induced Inflammation and Osteoclast Formation and Activity." J Bone Miner Res **32**(12): 2431-2444.

Krystel-Whittemore, M., K. N. Dileepan and J. G. Wood (2015). "Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell." Front Immunol **6**: 620.

Kulkarni, C. and D. F. Kinane (2014). "Host response in aggressive periodontitis." Periodontol 2000 **65**(1): 79-91.

Kwan Tat, S., M. Padrines, S. Theoleyre, D. Heymann and Y. Fortun (2004). "IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology." Cytokine Growth Factor Rev **15**(1): 49-60.

Lakkakorpi, P. T., M. A. Horton, M. H. Helfrich, E. K. Karhukorpi and H. K. Vaananen (1991). "Vitronectin receptor has a role in bone resorption but does not mediate tight sealing zone attachment of osteoclasts to the bone surface." J Cell Biol **115**(4): 1179-1186.

Landim de Barros, T., V. G. Brito, C. C. do Amaral, A. H. Chaves-Neto, A. P. Campanelli and S. H. Oliveira (2016). "Osteogenic markers are reduced in bone-marrow mesenchymal cells and femoral bone of young spontaneously hypertensive rats." Life Sci **146**: 174-183.

Langsetmo, L., C. L. Hitchcock, E. J. Kingwell, K. S. Davison, C. Berger, S. Forsmo, W. Zhou, N. Kreiger, J. C. Prior and G. Canadian Multicentre Osteoporosis Study Research (2012). "Physical activity, body mass index and bone mineral density-associations in a prospective population-based cohort of women and men: the Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos)." Bone **50**(1): 401-408.

Larjava, H., L. Koivisto, J. Heino and L. Hakkinen (2014). "Integrins in periodontal disease." Exp Cell Res **325**(2): 104-110.

Lee, Y. M., N. Fujikado, H. Manaka, H. Yasuda and Y. Iwakura (2010). "IL-1 plays an important role in the bone metabolism under physiological conditions." Int Immunol **22**(10): 805-816.

Leite, C. L., C. A. Redins, E. C. Vasquez and S. S. Meyrelles (2005). "Experimental-induced periodontitis is exacerbated in spontaneously hypertensive rats." Clin Exp Hypertens **27**(6): 523-531.

Leong, X. F., C. Y. Ng, B. Badiah and S. Das (2014). "Association between hypertension and periodontitis: possible mechanisms." ScientificWorldJournal **2014**: 768237.

Lesclous, P., D. Guez, A. Llorens and J. L. Saffar (2001). "Time-course of mast cell accumulation in rat bone marrow after ovariectomy." Calcif Tissue Int **68**(5): 297-303.

Li, X., S. Chen, V. Kantorovich, L. S. Cheng, D. H. Cohn, J. I. Rotter, H. Yang and J. S. Adams (2004). "Genetic determinants of osteoporosis susceptibility in a female Ashkenazi Jewish population." Genet Med **6**(1): 33-37.

Linden, G. J., M. C. Herzberg and E. F. P. A. A. P. w. working group 4 of the joint (2013). "Periodontitis and systemic diseases: a record of discussions of working group 4 of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases." J Periodontol **84**(4 Suppl): S20-23.

Lindhe, J., N. P. Lang, T. Berglundh, W. V. Giannobile and M. Sanz (2015). Clinical periodontology and implant dentistry, Wiley.

Liu, D., J. K. Xu, L. Figliomeni, L. Huang, N. J. Pavlos, M. Rogers, A. Tan, P. Price and M. H. Zheng (2003). "Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction." Int J Mol Med **11**(1): 17-21.

Liu, N., S. Shi, M. Deng, L. Tang, G. Zhang, N. Liu, B. Ding, W. Liu, Y. Liu, H. Shi, L. Liu and Y. Jin (2011). "High levels of beta-catenin signaling reduce osteogenic differentiation of stem cells in inflammatory microenvironments through inhibition of the noncanonical Wnt pathway." J Bone Miner Res **26**(9): 2082-2095.

Liu, X. H., A. Kirschenbaum, S. Yao and A. C. Levine (2006). "The role of the interleukin-6/gp130 signaling pathway in bone metabolism." Vitam Horm **74**: 341-355.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Lockhart, P. B., A. F. Bolger, P. N. Papapanou, O. Osinbowale, M. Trevisan, M. E. Levison, K. A. Taubert, J. W. Newburger, H. L. Gornik, M. H. Gewitz, W. R. Wilson, S. C. Smith, Jr., L. M. Baddour, E. American Heart Association Rheumatic Fever, C. o. E. Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, C. o. P. V. D. Prevention and C. Council on Clinical (2012). "Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association?: a scientific statement from the American Heart Association." Circulation **125**(20): 2520-2544.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.

Lund, S. A., C. M. Giachelli and M. Scatena (2009). "The role of osteopontin in inflammatory processes." J Cell Commun Signal **3**(3-4): 311-322.

Macedo Paizan, M. L. and J. F. Vilela-Martin (2014). "Is there an association between periodontitis and hypertension?" Curr Cardiol Rev **10**(4): 355-361.

Malachias, M. V. B., W. K. S. B. Souza, F. L. Plavnik, C. I. S. Rodrigues, A. A. Brandão and M. F. T. Neves (2016). "7ª Diretriz brasileira de hipertensão arterial." Arq Bras Cardiol **107**(3): 1-103.

Malcolm, J., O. Millington, E. Millhouse, L. Campbell, A. Adrados Planell, J. P. Butcher, C. Lawrence, K. Ross, G. Ramage, I. B. McInnes and S. Culshaw (2016). "Mast Cells Contribute to Porphyromonas gingivalis-induced Bone Loss." J Dent Res **95**(6): 704-710.

Malhotra, R., V. Grover, A. Kapoor and R. Kapur (2010). "Alkaline phosphatase as a periodontal disease marker." Indian J Dent Res **21**(4): 531-536.

Manrique, N., C. C. Pereira, L. M. Garcia, S. Micaroni, A. A. Carvalho, S. H. Perri, R. Okamoto, D. H. Sumida and C. Antoniali (2012). "Alveolar bone healing process in

spontaneously hypertensive rats (SHR). A radiographic densitometry study." J Appl Oral Sci **20**(2): 222-227.

Marjanovic, D., Z. Andjelkovic, Z. Brkic, G. Videnovic, M. Sehalic, V. Matvjenko, S. Lestarevic and N. Djordjevic (2016). "Quantification of mast cells in different stages of periodontal disease." Vojnosanit Pregl **73**(5): 458-462.

Mills, K. T., J. D. Bundy, T. N. Kelly, J. E. Reed, P. M. Kearney, K. Reynolds, J. Chen and J. He (2016). "Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries." Circulation **134**(6): 441-450.

Mirhafez, S. R., M. Mohebaty, M. Feiz Disfani, M. Saberi Karimian, M. Ebrahimi, A. Avan, S. Eslami, A. Pasdar, H. Rooki, H. Esmaeili, G. A. Ferns and M. Ghayour-Mobarhan (2014). "An imbalance in serum concentrations of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in hypertension." J Am Soc Hypertens **8**(9): 614-623.

Mori, T., T. Miyamoto, H. Yoshida, M. Asakawa, M. Kawasumi, T. Kobayashi, H. Morioka, K. Chiba, Y. Toyama and A. Yoshimura (2011). "IL-1beta and TNFalpha-initiated IL-6-STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis." Int Immunol **23**(11): 701-712.

Moschen, A. R., A. Kaser, B. Enrich, O. Ludwiczek, M. Gabriel, P. Obrist, A. M. Wolf and H. Tilg (2005). "The RANKL/OPG system is activated in inflammatory bowel disease and relates to the state of bone loss." Gut **54**(4): 479-487.

Moutsopoulos, N. M. and P. N. Madianos (2006). "Low-grade inflammation in chronic infectious diseases: paradigm of periodontal infections." Ann N Y Acad Sci **1088**: 251-264.

Mundy, G. R. (2007). "Osteoporosis and inflammation." Nutr Rev **65**(12 Pt 2): S147-151.

Naesse, E. P., O. Schreurs, K. Helgeland, K. Schenck and S. Steinsvoll (2003). "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival mast cells in persons with and without human immunodeficiency virus infection." J Periodontal Res **38**(6): 575-582.

Nagasaka, A., H. Matsue, H. Matsushima, R. Aoki, Y. Nakamura, N. Kambe, S. Kon, T. Uede and S. Shimada (2008). "Osteopontin is produced by mast cells and affects IgE-mediated degranulation and migration of mast cells." Eur J Immunol **38**(2): 489-499.

Nemeth, K., M. Schoppet, N. Al-Fakhri, S. Helas, R. Jessberger, L. C. Hofbauer and C. Goettsch (2011). "The role of osteoclast-associated receptor in osteoimmunology." J Immunol **186**(1): 13-18.

Newman, H. N. (1996). "Focal infection." J Dent Res **75**(12): 1912-1919.

Newman, M. G., H. H. Takei and F. n. A. Carranza (2006). Carranza's clinical periodontology. St. Louis, Mo., Saunders/Elsevier.

Newman, M. G., H. H. Takei, P. R. Klokkevold and F. n. A. Carranza (2014). Carranza's clinical periodontology. St. Louis, Mo., Elsevier/Saunders.

Nih Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, D. and Therapy (2001). "Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy." JAMA **285**(6): 785-795.

Noh, M. K., M. Jung, S. H. Kim, S. R. Lee, K. H. Park, D. H. Kim, H. H. Kim and Y. G. Park (2013). "Assessment of IL-6, IL-8 and TNF-alpha levels in the gingival tissue of patients with periodontitis." Exp Ther Med **6**(3): 847-851.

Nudelman, F., K. Pieterse, A. George, P. H. Bomans, H. Friedrich, L. J. Brylka, P. A. Hilbers, G. de With and N. A. Sommerdijk (2010). "The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors." Nat Mater **9**(12): 1004-1009.

Oh, Y., I. Oh, J. Morimoto, T. Uede and A. Morimoto (2014). "Osteopontin has a crucial role in osteoclast-like multinucleated giant cell formation." J Cell Biochem **115**(3): 585-595.

Ohki, T., Y. Itabashi, T. Kohno, A. Yoshizawa, S. Nishikubo, S. Watanabe, G. Yamane and K. Ishihara (2012). "Detection of periodontal bacteria in thrombi of patients with acute myocardial infarction by polymerase chain reaction." Am Heart J **163**(2): 164-167.

Okamoto, K. and K. Aoki (1963). "Development of a strain of spontaneously hypertensive rats." Jpn Circ J **27**: 282-293.

Oliveira, S. H., C. H. Costa, S. H. Ferreira and F. Q. Cunha (2002). "Sephadex induces eosinophil migration to the rat and mouse peritoneal cavity: involvement of mast cells, LTB4, TNF-alpha, IL-8 and PAF." Inflamm Res **51**(3): 144-153.

Olsen, I. (2015). "From the Acta Prize Lecture 2014: the periodontal-systemic connection seen from a microbiological standpoint." Acta Odontol Scand **73**(8): 563-568.

Orimo, H. (2010). "The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease." J Nippon Med Sch **77**(1): 4-12.

Ortega, N., D. Behonick, D. Stickens and Z. Werb (2003). "How proteases regulate bone morphogenesis." Ann N Y Acad Sci **995**: 109-116.

Panezai, J., A. Ghaffar, M. Altamash, K. G. Sundqvist, P. E. Engstrom and A. Larsson (2017). "Correlation of serum cytokines, chemokines, growth factors and enzymes with periodontal disease parameters." PLoS One **12**(11): e0188945.

Paraskevas, S., J. D. Huizinga and B. G. Loos (2008). "A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis." J Clin Periodontol **35**(4): 277-290.

Paul, M., A. Poyan Mehr and R. Kreutz (2006). "Physiology of local renin-angiotensin systems." Physiol Rev **86**(3): 747-803.

Pihlstrom, B. L., B. S. Michalowicz and N. W. Johnson (2005). "Periodontal diseases." Lancet **366**(9499): 1809-1820.

Plessas, A. (2014). "Nonsurgical periodontal treatment: review of the evidence." Oral Health Dent Manag **13**(1): 71-80.

Poulter, N. R., D. Prabhakaran and M. Caulfield (2015). "Hypertension." Lancet **386**(9995): 801-812.

Preshaw, P. M., A. L. Alba, D. Herrera, S. Jepsen, A. Konstantinidis, K. Makrilakis and R. Taylor (2012). "Periodontitis and diabetes: a two-way relationship." Diabetologia **55**(1): 21-31.

Preshaw, P. M., R. A. Seymour and P. A. Heasman (2004). "Current concepts in periodontal pathogenesis." Dent Update **31**(10): 570-572, 574-578.

Rai, R., S. Thiagarajan, S. Mohandas, K. Natarajan, C. Shanmuga Sekar and S. Ramalingam (2010). "Haim Munk syndrome and Papillon Lefevre syndrome--allelic mutations in cathepsin C with variation in phenotype." Int J Dermatol **49**(5): 541-543.

Ramamurthy, N. S., B. R. Rifkin, R. A. Greenwald, J. W. Xu, Y. Liu, G. Turner, L. M. Golub and A. T. Vernillo (2002). "Inhibition of matrix metalloproteinase-mediated periodontal bone loss in rats: a comparison of 6 chemically modified tetracyclines." J Periodontol **73**(7): 726-734.

Rao, K. N. and M. A. Brown (2008). "Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease." Ann N Y Acad Sci **1143**: 83-104.

Ribeiro, R. A., M. V. Souza-Filho, M. H. Souza, S. H. Oliveira, C. H. Costa, F. Q. Cunha and H. S. Ferreira (1997). "Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg." Int Arch Allergy Immunol **112**(1): 27-35.

Richards, D. (2014). "Review finds that severe periodontitis affects 11% of the world population." Evid Based Dent **15**(3): 70-71.

Rodan, G. A. and T. J. Martin (2000). "Therapeutic approaches to bone diseases." Science **289**(5484): 1508-1514.

Rodrigues, W. C., A. L. Fabris, J. S. Hassumi, A. Goncalves, C. K. Sonoda and R. Okamoto (2016). "Kinetics of gene expression of alkaline phosphatase during healing of alveolar bone in rats." Br J Oral Maxillofac Surg **54**(5): 531-535.

Rogers, J. E., F. Li, D. D. Coatney, C. Rossa, P. Bronson, J. M. Krieder, W. V. Giannobile and K. L. Kirkwood (2007). "Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis." J Periodontol **78**(3): 550-558.

Saarinen, J., N. Kalkkinen, H. G. Welgus and P. T. Kovanen (1994). "Activation of human interstitial procollagenase through direct cleavage of the Leu83-Thr84 bond by mast cell chymase." J Biol Chem **269**(27): 18134-18140.

Saftig, P., E. Hunziker, V. Everts, S. Jones, A. Boyde, O. Wehmeyer, A. Suter and K. von Figura (2000). "Functions of cathepsin K in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice." Adv Exp Med Biol **477**: 293-303.

Santos, C. F., A. C. Morandini, T. J. Dionisio, F. A. Faria, M. C. Lima, C. M. Figueiredo, B. L. Colombini-Ishikirama, C. R. Sipert, R. P. Maciel, A. P. Akashi, G. P. Souza, G. P. Garlet, C. O. Rodini, S. L. Amaral, C. Becari, M. C. Salgado, E. B. Oliveira, I. Matus, D. N. Didier and A. S. Greene (2015). "Functional Local Renin-Angiotensin System in Human and Rat Periodontal Tissue." PLoS One **10**(8): e0134601.

Sanz, M., K. Kornman and E. F. P. A. A. P. w. Working group 3 of joint (2013). "Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases." J Clin Periodontol **40** Suppl 14: S164-169.

Sasaki, H., Y. Okamatsu, T. Kawai, R. Kent, M. Taubman and P. Stashenko (2004). "The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss." J Periodontol Res **39**(6): 432-441.

Savoia, C. and E. L. Schiffrin (2006). "Inflammation in hypertension." Curr Opin Nephrol Hypertens **15**(2): 152-158.

Schou, S., P. Holmstrup, H. V. Worthington and M. Esposito (2006). "Outcome of implant therapy in patients with previous tooth loss due to periodontitis." Clin Oral Implants Res **17 Suppl 2**: 104-123.

Scott, D. A. and J. Krauss (2012). "Neutrophils in periodontal inflammation." Front Oral Biol **15**: 56-83.

Shahi, M., A. Peymani and M. Sahmani (2017). "Regulation of Bone Metabolism." Rep Biochem Mol Biol **5**(2): 73-82.

Sharma, C. G. and A. R. Pradeep (2006). "Gingival crevicular fluid osteopontin levels in periodontal health and disease." J Periodontol **77**(10): 1674-1680.

Shen, S., C. M. Xia and L. Y. Qiao (2015). "The urinary bladder of spontaneously hypertensive rat demonstrates bladder hypertrophy, inflammation, and fibrosis but not hyperplasia." Life Sci **121**: 22-27.

Shiota, N., J. Rysa, P. T. Kovanen, H. Ruskoaho, J. O. Kokkonen and K. A. Lindstedt (2003). "A role for cardiac mast cells in the pathogenesis of hypertensive heart disease." J Hypertens **21**(10): 1935-1944.

Silberstein, R., M. Melnick, G. Greenberg and C. Minkin (1991). "Bone remodeling in W/W^v mast cell deficient mice." Bone **12**(4): 227-236.

Silver, R. B., A. C. Reid, C. J. Mackins, T. Askwith, U. Schaefer, D. Herzlinger and R. Levi (2004). "Mast cells: a unique source of renin." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(37): 13607-13612.

Slany, A., V. Haudek-Prinz, A. Meshcheryakova, A. Bileck, W. Lamm, C. Zielinski, C. Gerner and J. Drach (2014). "Extracellular matrix remodeling by bone marrow fibroblast-like cells correlates with disease progression in multiple myeloma." J Proteome Res **13**(2): 844-854.

Sodek, J., B. Ganss and M. D. McKee (2000). "Osteopontin." Crit Rev Oral Biol Med **11**(3): 279-303.

Steffensen, B., A. H. Duong, S. B. Milam, C. L. Potempa, W. B. Winborn, V. L. Magnuson, D. Chen, G. Zardeneta and R. J. Klebe (1992). "Immunohistological localization of cell adhesion proteins and integrins in the periodontium." J Periodontol **63**(7): 584-592.

Steinsvoll, S., K. Helgeland and K. Schenck (2004). "Mast cells--a role in periodontal diseases?" J Clin Periodontol **31**(6): 413-419.

Svedha, P. R., J. Mahendra, R. Theayarajar and A. Namachivayam (2017). "Comparison of bone mineral density among pre- and post-menopausal women with and without chronic generalized periodontitis." J Indian Soc Periodontol **21**(2): 119-124.

Taylor, G. W. (2001). "Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective." Ann Periodontol **6**(1): 99-112.

- Tchougounova, E., A. Lundequist, I. Fajardo, J. O. Winberg, M. Abrink and G. Pejler (2005). "A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2." J Biol Chem **280**(10): 9291-9296.
- Teughels, W., R. Dhondt, C. Dekeyser and M. Quirynen (2014). "Treatment of aggressive periodontitis." Periodontol 2000 **65**(1): 107-133.
- Tezal, M., S. G. Grossi, A. W. Ho and R. J. Genco (2001). "The effect of alcohol consumption on periodontal disease." J Periodontol **72**(2): 183-189.
- Tonetti, M. S., T. E. Van Dyke and E. F. P. A. A. P. w. Working group 1 of the joint (2013). "Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases." J Clin Periodontol **40 Suppl 14**: S24-29.
- Vanderschueren, D., L. Vandenput, S. Boonen, M. K. Lindberg, R. Bouillon and C. Ohlsson (2004). "Androgens and bone." Endocr Rev **25**(3): 389-425.
- Vimalraj, S., B. Arumugam, P. J. Miranda and N. Selvamurugan (2015). "Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation." Int J Biol Macromol **78**: 202-208.
- Walsh, L. J. (2003). "Mast cells and oral inflammation." Crit Rev Oral Biol Med **14**(3): 188-198.
- Wang, C. J. and L. K. McCauley (2016). "Osteoporosis and Periodontitis." Curr Osteoporos Rep **14**(6): 284-291.
- Weitzmann, M. N. and R. Pacifici (2006). "Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale." J Clin Invest **116**(5): 1186-1194.
- Whitworth, J. A. and I. S. o. H. W. G. World Health Organization (2003). "2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension." J Hypertens **21**(11): 1983-1992.
- Wiebe, C. B., G. Petricca, L. Hakkinen, G. Jiang, C. Wu and H. S. Larjava (2008). "Kindler syndrome and periodontal disease: review of the literature and a 12-year follow-up case." J Periodontol **79**(5): 961-966.
- Williams, R. C. and S. Offenbacher (2000). "Periodontal medicine: the emergence of a new branch of periodontology." Periodontol 2000 **23**: 9-12.
- Winning, L. and G. J. Linden (2017). "Periodontitis and Systemic Disease: Association or Causality?" Curr Oral Health Rep **4**(1): 1-7.
- Woo, J., T. Kwok, J. Leung and N. Tang (2009). "Dietary intake, blood pressure and osteoporosis." J Hum Hypertens **23**(7): 451-455.
- Wright, H. J., I. L. Chapple, J. B. Matthews and P. R. Cooper (2011). "Fusobacterium nucleatum regulation of neutrophil transcription." J Periodontal Res **46**(1): 1-12.
- Yamazaki, K., T. Honda, H. Domon, T. Okui, K. Kajita, R. Amanuma, C. Kudoh, S. Takashiba, S. Koikeguchi, F. Nishimura, M. Kodama, Y. Aizawa and H. Oda (2007). "Relationship of periodontal infection to serum antibody levels to periodontopathic bacteria and inflammatory markers in periodontitis patients with coronary heart disease." Clin Exp Immunol **149**(3): 445-452.

Yamori, Y. J. D. S. (1994). The spontaneously hypertensive rat In Textbook of Hypertension. New York, Blackwell Scientific Publications.

Yillar, D. O. and C. Kucukhuseyin (2008). "The effects of compound 48/80, morphine, and mast cell depletion on electroshock seizure in mice." J Basic Clin Physiol Pharmacol **19**(1): 1-14.

Zhang, J. and G. P. Shi (2012). "Mast cells and metabolic syndrome." Biochim Biophys Acta **1822**(1): 14-20.

Zhang, Q., B. Chen, F. Yan, J. Guo, X. Zhu, S. Ma and W. Yang (2014). "Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases." Biomed Res Int **2014**: 284836.

ANEXOS

ANEXO 1 - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Papel dos mastócitos e via adrenérgica no metabolismo ósseo e sistêmico em ratos normotensos e hipertensos submetidos a doença periodontal experimental"**, Processo FOA nº 00686-2016, sob responsabilidade de Sandra Helena Penha de Oliveira apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 04 de Outubro de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 20 de Fevereiro de 2018.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 20 de Março de 2018.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Mast cell and adrenergic pathway roles on local and systemic bone metabolism on normotensive and hypertensive rats with experimental periodontal disease"**, Protocol FOA nº 00686-2016, under the supervision of Sandra Helena Penha de Oliveira presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 04, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 20, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 20, 2018.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Pérez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

