

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA**

REILA TAINÁ MENDES

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DA INIBIÇÃO DA CICLOOXIGENASE-2
EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE INDUZIDA POR
LIGADURA**

**PONTA GROSSA
2012**

REILA TAINÁ MENDES

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DA INIBIÇÃO DA CICLOOXIGENASE-2
EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE INDUZIDA POR
LIGADURA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa no curso de Mestrado em Odontologia – área de concentração em Clínica Integrada – Ênfase em Terapêutica Aplicada À Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio André dos Santos

**PONTA GROSSA
2012**

Ficha catalográfica elaborada pelo Setor Tratamento da Informação BICEN/UEPG

M538e Mendes, Reila Tainá
 Efeitos cardiovasculares da inibição da ciclooxigenase-2 em um
 modelo experimental de periodontite induzida por ligadura / Reila
 Tainá Mendes . Ponta Grossa, 2012.
 82f.
 Dissertação (Mestrado em Odontologia – área de concentração :
 Clínica Integrada – Ênfase em Terapêutica Aplicada à Clínica
 Odontológica), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes
 Co-orientador : Prof. Dr. Fábio André dos Santos

 1.Periodontite. 2. Ciclooxigenase-2. 3. Endotélio Vascular.
 I. Fernandes, Daniel. II. Santos, Fábio André dos. III.T.

CDD : 617.6

REILA TAINÁ MENDES

**EFEITOS CARDIOVASCULARES DA INIBIÇÃO DA CICLOOXIGENASE-2 EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada.

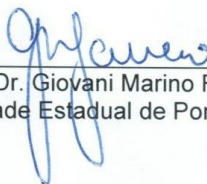
Ponta Grossa, 23 de fevereiro de 2012.



Prof. Dr. Daniel Fernandes
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco
Universidade de Taubaté



Prof. Dr. Giovanni Marino Favero
Universidade Estadual de Ponta Grossa

AGRADECIMENTOS

Ao professor doutor **Daniel Fernandes**, pela orientação, dedicação e paciência. Tive o privilégio de nesses dois anos de mestrado ter um orientador e um amigo.

Ao professor doutor **Fábio André dos Santos** pela co-orientação e valioso auxílio nos experimentos de periodontite induzida por ligadura.

Aos professores doutores **Gibson Luiz Pilatti** e **Giovani Marino Fávero**, por suas importantes contribuições no exame de qualificação.

Ao professor doutor **José Carlos Rebuglio Velloso**, pela ajuda com a análise hematológica.

E aos demais professores do programa de pós-graduação, que em muito contribuíram para minha formação.

À **Lorena Brito**, agora mestre em Ciências Farmacêuticas. Ao **Willian Machado**, aluno de mestrado em Ciências Farmacêuticas. Aos alunos de iniciação científica, **Luiz Renato Olchanheski Junior** e **Cassiano Pereira Stanczyk**, pela constante ajuda com os experimentos, companhia no biotério, risadas e pela amizade.

Às funcionárias do Biotério, **Maria da Luz da Silva Pereira** e **Marilene Terezinha Barbosa**, pela disponibilidade em auxiliar no manejo e alimentação dos animais.

A **Daniel Mendes**, doutorando em Ciências Farmacêuticas da UFPR, ao professor doutor **Michel Fleith Otuki** e a todo pessoal do Laboratório de Inflamação da UFPR, pela imensa ajuda com os trabalhos de histologia.

A todos meus colegas de turma de mestrado, que compartilharam momentos de alegria e “desespero” e tornaram esses dois anos mais agradáveis.

A meus professores de especialização, **Tertuliano Ricardo Lopes**, **Andrea Maria Souza**, **Carmen Mueller Storrer** e **Tatiana Miranda**

Deliberador. Por todo o aprendizado. Tiveram grande influência na minha escolha pelo mestrado.

A meus pais, **Marise** e **Gilson**, à minha avó **Nadyr** e à minha irmã **Noele**, pelo constante apoio.

À Fundação Araucária, pela bolsa e apoio financeiro.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa.

E principalmente a **DEUS**, por ter colocado cada uma dessas pessoas em minha vida, por me confortar e guiar meus passos a todo o momento.

MUITO OBRIGADA!

"A persistência é o menor caminho do êxito"

Charles Chaplin

DADOS CURRICULARES

REILA TAINÁ MENDES

NASCIMENTO 18.11.1986

Curitiba – Paraná – Brasil

FILIAÇÃO

Marise Maria Mendes

Gilson Antonio Mendes

2004-2007

Curso de Graduação em Odontologia
Universidade Federal do Paraná –
UFPR

2007

Curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia
Oral Menor –

Faculdade Uningá

2008-2009

Especialização em Periodontia –
Universidade Positivo - UP

2010-2012

Mestrado em Odontologia (em
andamento) na área de concentração
em Clínica Integrada –

Universidade Estadual de Ponta
Grossa - UEPG

RESUMO

MENDES RT. Efeitos Cardiovasculares da Inibição da Ciclooxygenase-2 em um Modelo Experimental de Periodontite em Ratos. [Dissertação de Mestrado em Clínica Integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2012.

A periodontite é uma doença inflamatória crônica iniciada e perpetuada por bactérias anaeróbicas gram-negativas que colonizam a área subgengival. Esta doença é caracterizada pela destruição do tecido periodontal de inserção, reabsorção óssea, infiltração de leucócitos e formação de bolsa periodontal. Estudos observacionais têm mostrado um significativo aumento do risco de doenças cardiovasculares, principalmente aterosclerose e hipertensão, entre pessoas com periodontite. A literatura mostra também a presença de disfunção endotelial nesses pacientes. Os dados sugerem que a inflamação sistêmica induzida pela microbiota presente na doença periodontal e a diminuição na biodisponibilidade do óxido nítrico podem ser, pelo menos em parte, a causa da disfunção endotelial, que por sua vez leva a doenças cardiovasculares. Um aumento na expressão vascular da ciclooxygenase-2 (COX-2) tem sido consistentemente demonstrado em patologias que apresentam disfunção endotelial. A expressão da COX-2 nesta condição parece ter um importante papel protetor através da produção de metabólitos do ácido araquidônico com propriedades vasodilatadoras e antitrombóticas. Dessa maneira, a inibição da COX-2 pode apresentar aspectos cardiovasculares negativos. Assim, a proposta deste trabalho foi avaliar o efeito da inibição COX-2 sobre a reatividade vascular e sobre o tecido cardíaco de animais com periodontite. No dia 0, ratos Wistar foram subdivididos nos seguintes grupos: ligadura + etoricoxibe (receberam ligaduras e foram medicados com etoricoxibe 10 mg/kg v.o. por sete dias, a partir do dia 14), ligadura + veículo (receberam água destilada), falso-operado + etoricoxibe (passaram pelo procedimento de falsa-cirurgia, as ligaduras foram colocadas e imediatamente removidas) e falso-operado + veículo. Os animais foram preparados para aferição dos dados e sacrificados no dia 21. Não foram observadas alterações na resposta vasoconstritora, porém o grupo ligadura + etoricoxibe mostrou uma tendência em ter a resposta vasodilatadora reduzida. Quando submetidos à isquemia com isoprenalina, todos os grupos apresentaram alterações histológicas cardíacas, especialmente os que receberam etoricoxibe. Sugere-se, pois, que a inibição da COX-2 em um modelo experimental de periodontite exacerbe alterações cardiovasculares.

Palavras-chave: Periodontite. Ciclooxygenase-2. Endotélio Vascular.

ABSTRACT

MENDES RT. **Cardiovascular Effects of the Cyclooxygenase-2 Inhibition in an Experimental Model of Periodontitis in Rats.** [Dissertação de Mestrado em Clínica Integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2012.

Periodontal disease is an inflammatory chronic disorder caused by a small group of gram-negatives bacteria witch colonizes the subgingival area. This disease is characterized by the destruction of the periodontal tissues, including bone resorption and loss of clinical attachment level. Observational studies have shown an increase in the risk of cardiovascular diseases, specially atherosclerosis and hypertension, among the subjects affected by the periodontal disease. The literature also reports endothelial dysfunction among these patients. Data suggest that the systemic inflammation due to the biofilm present in periodontitis and the reduction in the nitric oxide availability may be, at least in part, the cause of endothelial dysfunction, which leads to cardiovascular disorders. An increase in vascular COX-2 expression has been demonstrated among diseases related to endothelial dysfunction. COX-2 expression seems to have an important protector function through the production of arachidonic acid metabolites with vasodilator and antitrombotic properties. Therefore, COX-2 inhibition may represent negative cardiovascular implications. The purpose of this research was to evaluate the effect of COX-2 inhibition on the vascular reactivity and on the heart tissue of animals with periodontitis. At day 0, Wistar rats were subdivided into the following groups: ligature + etoricoxib (the animals received ligatures and were treated with etoricoxib 10 mg/kg p.o., for seven days, from the day 14), ligature + vehicle (the animals were treated with distilled water), sham + etoricoxib (the animals went through a sham procedure: the ligatures were positioned and immediately removed) and sham + vehicle. The rats were prepared for the data collection and sacrificed at day 21. Changes on the vasoconstrictor response were not observed. However, the group ligature + etoricoxib showed a tendency to have the vasodilator response reduced. All the groups showed histological cardiac alterations, especially the groups that received etoricoxib, when submitted to ischemia with isoprenaline. It is suggested, though, that COX-2 inhibition in an experimental model of periodontal disease may increase cardiovascular disorders.

Key-words: Periodontitis. Cyclooxygenase-2. Vascular Endothelium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Papel do óxido nítrico (NO) sobre a homeostase vascular.....	25
Figura 2 -	As vias da Ciclooxigenase (COX).....	27
Figura 3 -	Efeitos vasculares da Prostaciclina (PGI ₂) e Tromboxano (TXA ₂).....	31
Figura 4 -	Balanco entre mediadores pró-aterogênicos e anti-aterogênicos.....	33
Figura 5 -	Representação esquemática da idéia e objetivos centrais do trabalho - Efeito da inflamação sistêmica decorrente da periodontite sobre a célula endotelial.....	35
Figura 6 -	Colocação das ligaduras nos ratos.....	37
Figura 7 -	Preparo do animal para avaliação dos parâmetros cardiovasculares e administração dos agentes vasoativos.....	38
Figura 8 -	Registro típico das alterações na pressão arterial média e frequência cardíaca induzidas pela fenilefrina e pela angiotensina II.....	39
Figura 9 -	Registro típico das alterações na pressão arterial média e frequência cardíaca induzidas pela isoprenalina.....	39
Figura 10 -	Registro típico das alterações na pressão arterial média e frequência cardíaca induzidas pela acetilcolina.....	40
Figura 11 -	Registro típico das alterações na pressão arterial média e frequência cardíaca induzidas pelo nitroprussiato de sódio.....	40
Figura 12 -	Maxilares preparados para mensuração da perda óssea.....	42
Figura 13 -	Representação cronológica do experimento.....	45
Figura 14 -	Representação cronológica do experimento com inibição precoce da COX-2.....	46
Figura 15 -	Representação cronológica do experimento para análise histológica cardíaca.....	47
Figura 16 -	Representação da perda óssea alveolar média em um modelo de periodontite com inibição precoce da COX-2.....	48
Figura 17 -	Representação da perda óssea alveolar média.....	49
Figura 18 -	Efeito do etoricoxibe sobre a concentração plasmática de NOx (µmol/L) em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.....	50

Figura 19 -	Efeito do etoricoxibe sobre a queda de pressão arterial média (mmHg) induzida pela acetilcolina em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.....	51
Figura 20 -	Efeito do etoricoxibe sobre a queda de pressão arterial média (mmHg) induzida pelo nitroprussiato de sódio em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.....	52
Figura 21 -	Efeito do etoricoxibe sobre o aumento de pressão arterial média (mmHg) induzido pela fenilefrina em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.....	52
Figura 22 -	Efeito do etoricoxibe sobre o aumento de pressão arterial média (mmHg) induzido pela angiotensina II em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.....	53
Figura 23 -	Efeito do etoricoxibe sobre a pressão arterial média (mmHg) em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.....	53
Figura 24 -	Efeito do etoricoxibe sobre a frequência cardíaca (bpm) em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.....	54
Figura 25 -	Efeito do etoricoxibe sobre o aumento de frequência cardíaca induzido pela isoprenalina em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.....	55
Figura 26 -	Efeito do etoricoxibe sobre a queda de pressão arterial induzida pela isoprenalina em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.....	55
Figura 27 -	Efeito do etoricoxibe sobre o tecido cardíaco em resposta a doses subcutâneas de isoprenalina de animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.....	57
Figura 28 -	Representação esquemática das considerações finais do trabalho – Efeitos da inflamação sistêmica decorrente da periodontite sobre o sistema cardiovascular.....	70
Quadro 1-	Estudos que avaliaram a função endotelial de pacientes com doença periodontal.....	23
Quadro 2-	Inibidores seletivos da COX-2.....	29

TABELA

Tabela 1	Quantificação dos componentes sanguíneos dos respectivos grupos experimentais.....	50
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COX	ciclooxigenase
COX-1	ciclooxigenase – 1
COX-2	ciclooxigenase – 2
COX-3	ciclooxigenase – 3
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGI ₂	prostaglandina I ₂ (prostaciclina)
ICAM-1	molécula de adesão intercelular 1
V-CAM-1	molécula de adesão vascular celular 1
LPS	lipopolissacarídeo
TNF- α	fator de necrose tumoral α
DP	doença periodontal
DAC	doença arterial coronariana
NOS	óxido nítrico sintetase
NOS-1	óxido nítrico sintetase – 1
NOS-2	óxido nítrico sintetase – 2
NOS-3	óxido nítrico sintetase – 3
iNOS	óxido nítrico sintetase induzida
eNOS	óxido nítrico sintetase endotelial
NO	óxido nítrico
PGH ₂	prostaglandina H ₂ (endoperóxido de prostaglandina instável)
PG	prostaglandina
PGs	prostaglandinas
AINE	antiinflamatório não esteroide
IMV	intramuscular
TXA ₂	tromboxano
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
NOx	metabólitos de óxido nítrico – nitrito e nitrato
ALFAC	85% de etanol 80%, 10% de formol 40% e 5% de ácido acético glacial
HCl	ácido clorídrico
PBS	solução salina tamponada
SEM	erro padrão da média

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcento
US\$	dólar
g	grama
±	mais ou menos
°C	grau Celsius
h	hora
μL	microlitro
mg	miligrama
kg	quilograma
nmol	nano mol
pmol	pico mol
M	molar
v	volume
mL	mililitro
mm	milímetro
N	normal
<	menor
>	maior

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	DOENÇA PERIODONTAL.....	19
2.2	RELAÇÃO ENTRE DOENÇA PERIODONTAL E DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	19
2.3	A DOENÇA PERIODONTAL E A FUNÇÃO ENDOTELIAL.....	22
2.4	CICLOOXIGENASES.....	26
2.5	INIBIÇÃO SELETIVA DA CICLOOXIGENASE-2.....	28
2.5.1	BASE BIOLÓGICA PARA COMPLICAÇÕES CARDIOVASCULARES RELATIVAS AOS INIBIDORES DAS CICLOOXIGENASES.....	30
3.	PROPOSIÇÃO.....	34
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1	CARACTERÍSTICA DA AMOSTRA.....	36
4.2	INDUÇÃO DA PERIODONTITE ATRAVÉS DE LIGADURAS.....	36
4.3	ADMINISTRAÇÃO DA MEDICAÇÃO.....	37
4.4	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS VASCULARES.....	37
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO E NITRATO (NOx).....	41
4.6	AVALIAÇÃO DA REABSORÇÃO ÓSSEA PERIODONTAL.....	41
4.7	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO CORAÇÃO PÓS-INFARTO.....	42
4.8	COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS.....	43
4.9	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	44
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5.	RESULTADOS.....	48
5.1	PERDA ÓSSEA ALVEOLAR MÉDIA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO PRECOCE DA COX-2 – CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO ETORICOXIBE....	48
5.2	PERDA ÓSSEA ALVEOLAR MÉDIA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO TARDIA DA COX-2.....	49

5.3	QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO E NITRATO (NO _x) EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO TARDIA DA COX-2.....	50
5.4	HEMOGRAMA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO TARDIA DA COX-2.....	50
5.5	PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO TARDIA DA COX-2.....	51
5.6	AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE CARDÍACA: RESPOSTA À ISOPRENALINA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO TARDIA DA COX-2.....	54
5.7	HISTOLOGIA CARDÍACA DOS RATOS INFARTADOS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO TARDIA DA COX-2.....	56
6.	DISCUSSÃO.....	58
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
	REFERÊNCIAS.....	71
	ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL.....	83

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal se inicia pela inflamação gengival, conhecida como gengivite. Quando não tratada, a gengivite pode progredir de modo que a inflamação afete os tecidos de suporte dental, ocasionando a periodontite (Cochran¹ 2008). A doença periodontal tem como principal fator etiológico o biofilme dental (Hamp et al.² 1975), e consiste num processo infeccioso caracterizado pela perda de inserção induzida por patógenos periodontais presentes no sulco gengival (DeSanctis, Murphy³ 2000), ocorrendo formação de bolsa periodontal, infiltração de leucócitos e reabsorção óssea. Além de uma microbiota favorável, inúmeras outras condições têm papel fundamental na progressão da doença como a predisposição genética, o tabagismo e o autocontrole da placa bacteriana (Renvert, Persson⁴ 2002). A doença periodontal manifesta-se na sua forma moderada entre 44% a 57% dos adultos, sendo que 10% deles, em países desenvolvidos, têm periodontite avançada (Brown et al.⁵ 1996).

Sugere-se que a inflamação decorrente da doença periodontal tenha repercussão sistêmica no organismo. O conceito de infecção focal foi formalizado por Billings⁶ (1912). Desde então, surgiu o interesse a respeito da contribuição da infecção bucal para desordens em tecidos e órgãos distantes. O estudo da infecção/inflamação bucal como fator de risco para outras doenças começou em 1989, com um artigo finlandês a respeito da associação de doença dental e perda dentária com doença cardiovascular (Mattila et al.⁷ 1989). Hoje está firmemente estabelecido que é verdadeira a associação entre periodontite e doenças cardíacas; a lacuna a ser preenchida, no entanto, é qual a relevância bem como a natureza dessa associação (Demmer, Desvarieux⁸ 2006).

Alguns estudos têm mostrado um significativo aumento do risco de doenças cardiovasculares, principalmente aterosclerose e hipertensão, entre pessoas expostas à doença periodontal. Mais recentemente alguns trabalhos relatam a presença de disfunção endotelial em pacientes com periodontite. Os dados sugerem que a inflamação sistêmica induzida pela microbiota presente na doença periodontal e a diminuição na biodisponibilidade do óxido nítrico podem ser, pelo menos em parte, a causa da disfunção

endotelial, que por sua vez é fator predisponente para doenças cardiovasculares.

Um aumento na expressão vascular da ciclooxygenase-2 (COX-2) tem sido consistentemente demonstrado em patologias que apresentam disfunção endotelial. As ciclooxygenases (COX) são enzimas altamente conservadas evolutivamente, e existem em duas formas distintas, COX-1 e COX-2, sendo codificadas por dois diferentes genes (Grosser et al.⁹ 2002). Tanto a COX-1 como a COX-2 formam um endoperóxido de prostaglandina instável, o PGH₂, a partir do ácido araquidônico. A PGH₂ é transformada por várias enzimas e também por mecanismos não-enzimáticos em tromboxano e nas séries de prostaglandinas D, F e I, sendo estes compostos coletivamente conhecidos como prostanóides. A COX é, portanto, responsável pelos dois primeiros passos na síntese de prostanóides, sendo as etapas posteriores dependentes de enzimas tecido-específicas.

Embora a expressão da COX-2 esteja geralmente relacionada com a produção de PGE₂, uma prostaglandina que marcadamente contribui para o desenvolvimento de um processo inflamatório, sua expressão em células endoteliais representa uma importante contribuição para produção de prostaciclina (PGI₂), um derivado do ácido araquidônico com propriedades vasodilatadoras e antitrombóticas. Desta forma, sugere-se que a indução da COX-2 em células endoteliais possa contrabalancear a redução na produção de óxido nítrico, um mediador importante no controle do tônus vascular e da agregação plaquetária. Diante deste cenário, a inibição da COX-2 pode apresentar aspectos cardiovasculares deletérios.

Os inibidores seletivos para COX-2 como etoricoxibe, que surgiram devido aos efeitos adversos gastrointestinais resultantes da inibição não seletiva da COX, têm sido utilizados com sucesso para o tratamento da dor e inflamação em alguns pacientes com periodontite. Entretanto o efeito destes fármacos sobre variáveis cardiovasculares tem sido negligenciado. Assim, a proposta deste trabalho é avaliar o papel da COX-2 em vasos de animais com periodontite induzida, bem como o impacto da sua inibição sobre o tecido cardíaco e sobre o tônus vascular desses animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal é uma desordem infecciosa e inflamatória, que tem como principal fator etiológico o biofilme dental (Hamp et al.² 1975). Inicia-se como uma inflamação marginal dos tecidos periodontais denominada gengivite. Quando não tratada, pode evoluir e atingir os tecidos de suporte dental, condição que caracteriza a periodontite e acarreta na perda de inserção clínica.

É iniciada e perpetuada por um pequeno grupo de bactérias anaeróbicas gram-negativas que colonizam a área subgengival (Page, Kornman¹⁰ 1997). Esta doença é caracterizada pela destruição do tecido periodontal de inserção, reabsorção óssea, infiltração de leucócitos e formação de bolsa periodontal. A inflamação decorrente da periodontite afeta não somente os tecidos bucais, mas tem repercussão sistêmica no organismo (Lamster et al.¹¹ 2008). A doença periodontal é comprovadamente associada a desordens sistêmicas, dentre elas infecções respiratórias, complicações diabéticas, complicações no período gestacional e doenças cardiovasculares. O estudo da infecção/inflamação bucal como fator de risco para outras doenças começou em 1989, com um artigo finlandês a respeito da associação de doença dental e perda dentária com doença cardiovascular. Nesse estudo caso-controle, realizado a fim de se buscar entender a relação entre a condição de saúde bucal e o infarto agudo do miocárdio, após controlar variáveis de confusão como gênero e idade os autores mostraram que os pacientes com infarto agudo do miocárdio apresentaram pior condição bucal (Mattila et al.⁷ 1989).

2.2 RELAÇÃO ENTRE DOENÇA PERIODONTAL E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Está firmemente estabelecido que é verdadeira a associação entre periodontite e doenças cardíacas; a lacuna a ser preenchida no entanto, é qual a relevância bem como a natureza dessa associação. Assim, fica a

questão se a doença periodontal é um fator de risco para doença cardiovascular ou apenas contribui para o processo. É importante lembrar que a doença periodontal e as doenças cardiovasculares comungam de alguns mesmos fatores de risco, como idade avançada, gênero masculino, tabagismo e diabetes (Demmer, Desvarieux⁸ 2006).

Um dos possíveis mecanismos pelo qual a periodontite se relaciona a complicações cardiovasculares seria através dos periodontopatógenos, dentre eles o *Porphyromonas gingivalis* conforme dados da *American Dental Hygiene Association* (Lamster et al.¹¹ 2008). *Porphyromonas gingivalis* é um dos mais importantes periodontopatógenos e está associado à agregação plaquetária, aumento de moléculas de adesão como ICAM-1 e VCAM-1, P-selectina, proliferação de células do músculo liso e decréscimo da função vasomotora (Assinger et al.¹² 2011). Esse aumento de ICAM-1 e VCAM-1 se deve, em parte, ao LPS e outras citocinas inflamatórias. Vale salientar que tanto moléculas de adesão intercelular como moléculas de adesão de células vasculares estão associadas à formação de ateromas (Genco et al.¹³ 2002). Em estudo observacional, do qual fizeram parte 6017 pacientes, a doença periodontal se mostrou como fator de risco para aterosclerose, com considerável influência na patogenia da formação de ateromas (Beck et al.¹⁴ 2001). Em um estudo com animais, *Porphyromonas gingivalis* foi associado a um aumento nos níveis de colesterol e à formação de ateromas quando inoculados em ratos por via oral (Lalla et al.¹⁵ 2003). Convergingo com o trabalho de Maekawa et al.¹⁶ (2011), o qual mostrou que a inoculação oral de *Porphyromonas gingivalis*, em animais, foi associada a um aumento no perfil lipídico bem como a um aumento das lesões ateroscleróticas, o que é de grande importância visto que a aterosclerose é a principal via de doença coronariana (Maekawa et al.¹⁶ 2011). Essa relação pode ser tanto direta (pela translocação de microrganismos na corrente sanguínea) como indireta, devido à produção de mediadores inflamatórios na bolsa periodontal que conseqüentemente caem na circulação sanguínea (Behle, Papapanou¹⁷ 2006). A liberação de LPS na circulação periférica também pode ser o fator causal, com conseqüente inflamação sistêmica, ativação de células circulantes inflamatórias e células endoteliais (Lalla et al.¹⁵ 2003). Além de aumentar a expressão de moléculas de adesão, o LPS ativa vias intracelulares que levam à

produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , que por sua vez contribui para aterosclerose através da estimulação de adesão leucocitária e recrutamento de células inflamatórias (Ohta et al.¹⁸ 2005).

Na primeira fase da infecção periodontal, LPS e toxinas bacterianas são liberados e caem na corrente sanguínea, ocasionando uma resposta inflamatória aguda (Carranza et al.¹⁹ 2010). O sistema vascular tem papel primordial nessa fase, através do recrutamento de leucócitos e regulação do tônus e da permeabilidade vascular (Dauphinee, Karsan²⁰ 2006). Durante o processo inflamatório, o infiltrado de neutrófilos gera a produção de espécies reativas de oxigênio. Tal estresse oxidativo se associa à diminuição na disponibilidade de óxido nítrico e ao desenvolvimento de hipertensão (Tsioufis et al.²¹ 2011).

Genco et al.¹³ (2002) mostraram que a presença de *Tanerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis* aumenta a chance para infarto agudo do miocárdio em 2,99 e 2,52 vezes, respectivamente. Os autores mostram, ainda, que a associação entre doença periodontal e doença cardiovascular é independente de outros fatores como idade, sexo, raça, pressão arterial, nível sérico de colesterol, diabetes, situação financeira, estado civil, índice de massa corpórea e etilismo (Genco et al.¹³ 2002). Tais dados corroboram com o estudo de Desvarieux et al.²² (2005), no qual os autores mostram que indivíduos com um maior número de periodontopatógenos apresentam maior espessura da camada interna íntima da carótida, sendo a infecção periodontal relacionada à aterosclerose subclínica (Desvarieux et al.²² 2005). Porém, há controvérsia. Hujoel et al.²³ (2000), em estudo coorte, não observaram associação verdadeira entre doença periodontal e doença arterial coronariana (Hujoel et al.²³ 2000).

Em estudo observacional, do qual fizeram parte 1446 pacientes e cujo objetivo foi avaliar a possível associação entre pressão arterial diastólica elevada e bolsas periodontais profundas, os autores concluem que bolsas iguais ou mais profundas que 5 mm estão significativamente associadas a pressão arterial elevada (Engström et al.²⁴ 2007). Tais dados convergem com o estudo de Tsioufis et al.²¹ (2011), no qual os autores mostram que uma profundidade de sondagem maior que 3 mm se associa à elevação da pressão

arterial diastólica, bem como pacientes com periodontite apresentam maior contagem de células brancas (Tsioufis et al.²¹ 2011).

Em estudo clínico, cujo objetivo foi analisar a associação entre a destruição periodontal e doença arterial coronariana, bem como a relação entre infecção periodontal e síndrome coronariana aguda de 201 pacientes, ficou evidente que uma maior destruição periodontal se associa a maior severidade da doença cardíaca coronariana, e a infecção periodontal se associa a uma maior precariedade do estado clínico cardíaco (Gotsman et al.²⁵ 2007). Engebretson et al.²⁶ (2005) em estudo observacional, demonstraram que doença periodontal crônica avançada (determinada por meio da destruição óssea horizontal verificada através de radiografia panorâmica), associa-se positivamente à aterosclerose (Engebretson et al.²⁶ 2005). A terapia periodontal, por sua vez, associa-se à melhoria da inflamação sistêmica bem como da doença cardiovascular subclínica (Demmer, Desvarieux⁸ 2006).

2.3 A DOENÇA PERIODONTAL E A FUNÇÃO ENDOTELIAL

A presença de inflamação sistêmica pode afetar diretamente o endotélio vascular (Tonetti et al.²⁷ 2007). Embora não seja claro o mecanismo pelo qual a doença periodontal é relacionada com doenças cardiovasculares, acredita-se que a inflamação sistêmica induzida pela microbiota presente na doença periodontal possa contribuir para o desenvolvimento de disfunção endotelial (Ekuni et al.²⁸ 2009). Os dados sugerem que essa inflamação sistêmica e a conseqüente diminuição na biodisponibilidade do óxido nítrico podem ser, pelo menos em parte, a causa da disfunção endotelial, que por sua vez leva a doenças cardiovasculares. Mais recentemente alguns trabalhos têm mostrado a presença de disfunção endotelial em pacientes com periodontite (Higashi et al.²⁹ 2008, Higashi et al.³⁰ 2009), conforme mostra quadro 1. Esta disfunção endotelial estaria na gênese da relação entre doença periodontal e problemas cardiovasculares (Paquette et al.³¹ 2007). A periodontite se associa à disfunção endotelial em indivíduos sem riscos cardiovasculares, bem como em pacientes hipertensos. Tanto a periodontite como a disfunção endotelial, independente ou concomitantemente, levam à aterosclerose, resultando em

complicações cardiovasculares (Higashi et al.²⁹ 2008), sendo estas últimas uma das maiores causas de morte no mundo (Dahlof³² 2010).

Referência	Objetivo	n	Achados clínicos
Amar et al.³³ 2003	Avaliar a relação da DP com disfunção endotelial e com inflamação sistêmica	55	DP severa se associa a disfunção endotelial e a altos níveis de proteína C-reativa
Mercanoglu et al.³⁴ 2004	Avaliar a possível relação entre DP e disfunção endotelial	54	Pacientes com DP apresentam disfunção endotelial antes mesmo de qualquer evidência de aterosclerose
Seinost et al.³⁵ 2005	Avaliar a presença de disfunção endotelial na DP	61	DP severa gera disfunção endotelial O tratamento da DP melhora a função endotelial
Blum et al.³⁶ 2007	Determinar a associação entre DP e disfunção endotelial; avaliar o impacto da terapia periodontal sobre a função endotelial	13	Pacientes com DP apresentaram severa disfunção endotelial, que melhorou significativamente após terapia periodontal
Tonetti et al.²⁷ 2007	Avaliar a função endotelial de pacientes com DP e sob terapia periodontal	120	A terapia periodontal se associa à melhora da função endotelial
Higashi et al.²⁹ 2008	Avaliar a função endotelial de pacientes com DP e sem riscos cardiovasculares, bem como de pacientes com DP e hipertensos	116	A DP se associa à disfunção endotelial em pacientes com ou sem riscos cardiovasculares
Higashi et al.³⁰ 2009	Avaliar a função endotelial de pacientes com DP e DAC	101	A DP aumenta a disfunção endotelial de pacientes com DAC A terapia periodontal melhora a função endotelial de pacientes com DAC

Quadro 1: Estudos que avaliaram a função endotelial de pacientes com doença periodontal.
Nota: DAC: Doença Arterial Coronariana; DP: Doença Periodontal

Considerando que as células endoteliais cobrem a árvore vascular de todos os órgãos e são as primeiras células a entrar em contato com bactérias e produtos bacterianos disseminados na corrente sanguínea, é fácil compreender que estas células serão facilmente afetadas por um processo

infecioso/inflamatório. É importante lembrar que as células endoteliais superam em números todas as outras células em cada órgão. Mais de 60 trilhões de células endoteliais formam o maior órgão interconectado do corpo humano, com uma massa de aproximadamente três quilogramas e cobrindo uma extensão de quatro mil metros quadrados (para revisão ver Aird³⁷ 2007). Para manter a homeostasia o endotélio produz componentes da matriz extracelular como colágeno e uma grande variedade de mediadores químicos regulatórios, como por exemplo, óxido nítrico, prostacilina, endotelina 1 e angiotensina II (Quyyumi³⁸ 1998). Em condições fisiológicas há um balanço entre fatores relaxantes derivados do endotélio, como o óxido nítrico e fatores constritores derivados do endotélio como a endotelina 1. Na disfunção endotelial a biodisponibilidade do óxido nítrico é reduzida e este balanço é alterado, predispondo a complicações cardiovasculares (Tan et al.³⁹ 2002). Desta forma, o endotélio, outrora considerado uma simples barreira com permeabilidade seletiva entre o sangue e outras paredes vasculares, é agora reconhecido como um órgão homeostático crucial, fundamental para regulação do tônus e da estrutura vascular (Versari et al.⁴⁰ 2009).

Como dito acima, em condições fisiológicas as células endoteliais produzem óxido nítrico, que por sua vez se difunde para o tecido circundante, exercendo uma atividade protetora cardiovascular através do relaxamento de células de músculo liso, prevenindo a adesão e migração de leucócitos na parede vascular, a proliferação de células de músculo liso, agregação e adesão de plaquetas e a expressão de moléculas de adesão (Kawashima⁴¹ 2004, Khan et al.⁴² 1996), assim como mostra a figura 1. O óxido nítrico é produzido por uma família de enzimas chamadas de óxido nítrico sintetases (NOS). Existem pelo menos três isoformas de óxido nítrico sintetases. Cada isoforma é produto de um gene distinto. A NOS-1, também chamada de neuronal é encontrada em altos níveis em neurônios, bem como em tecidos não neuronais. A NOS-2 é também conhecida como óxido nítrico sintase induzida (iNOS). A NOS-3, também chamada de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), foi a enzima originalmente encontrada como responsável pela produção do fator relaxante derivado do endotélio (Furchgott, Zawadzki⁴³ 1980). Em algumas condições patológicas, incluindo a presença de fatores de risco cardiovasculares, o endotélio sofre alterações funcionais e estruturais, perdendo sua atividade

protetora e favorecendo o surgimento de complicações cardiovasculares. A principal característica desta situação é um prejuízo na biodisponibilidade do óxido nítrico. Isto pode ser consequência tanto de uma redução na produção a partir da NOS-3 como por um aumento na degradação do NO por espécies reativas de oxigênio (Verma et al.⁴⁴ 2003).

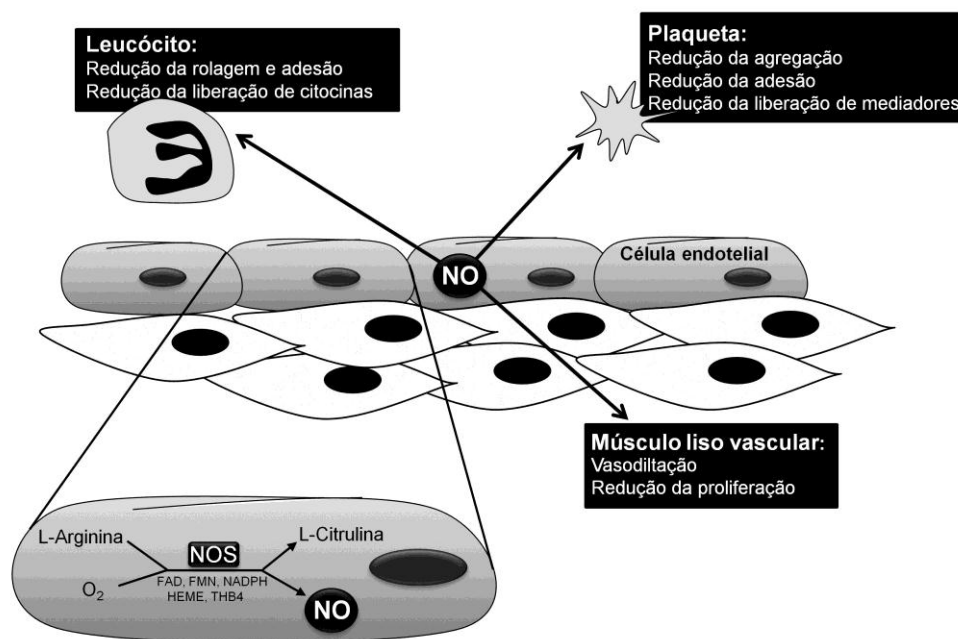


Figura 1: Papel do óxido nítrico (NO) sobre a homeostase vascular.

Nota: O óxido nítrico (NO) é produzido na célula endotelial vascular a partir do aminoácido L-arginina em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Além da clássica ação vasodilatadora, o NO previne adesão e migração de leucócitos na parede vascular, proliferação de células do músculo liso, agregação e adesão de plaquetas e a expressão de moléculas de adesão.

Diante do prejuízo na biodisponibilidade do óxido nítrico o endotélio pode implementar vários mecanismos fisiológicos na tentativa de compensar a deficiência de óxido nítrico. Neste sentido vários trabalhos relatam o aumento da expressão de COX-2 em situações de inflamação sistêmica com consequente disfunção endotelial (Foudi et al.⁴⁵ 2009). Desta forma, assim como acontece no diabetes e hipertensão (Bulut et al.⁴⁶ 2003, Nacci et al.⁴⁷ 2009), a COX-2 pode ter um papel vascular protetor na periodontite, contrabalanceando a disfunção endotelial através da produção de prostanóides vasodilatadores.

Inibidores de COX-2 como celecoxibe e etoricoxibe têm sido utilizados com sucesso, preemptivamente ou após cirurgias periodontais, no controle da dor e inflamação de pacientes com periodontite (Pilatti et al.⁴⁸ 2006, Steffens et al.⁴⁹ 2010). Adicionalmente, estudos pré-clínicos têm mostrado que estes fármacos previnem a perda óssea em um modelo de periodontite experimental (Holzhausen et al.⁵⁰ 2005, Azoubel et al.⁵¹ 2007). Entretanto os efeitos cardiovasculares da utilização destes fármacos na periodontite não foram ainda avaliados.

2.4 CICLOOXIGENASES

O ácido araquidônico é um ácido graxo essencial obtido a partir da dieta ou indiretamente através da conversão do ácido linoléico (Das⁵² 2006). Este ácido graxo é o precursor de uma larga família de compostos bioativos conhecidos como eicosanóides. Em razão da potência biológica destes compostos, o ácido araquidônico é mantido em níveis muito baixos na célula através da sua esterificação com fosfolipídios de membrana. Desta forma a disponibilidade de ácido araquidônico livre é descrita como a etapa limitante na produção de eicosanóides (para revisão ver Shimizu⁵³ 2009). O ácido araquidônico é liberado da membrana plasmática por ação da enzima fosfolipase A₂, dando início a uma cascata metabólica que tem início por ação da prostaglandina G/H sintase, comumente chamada ciclooxigenase (COX). As ciclooxigenases (COX) são enzimas altamente conservadas evolutivamente, e existem em duas formas distintas, COX-1 e COX-2, sendo codificadas por dois diferentes genes (Grosser et al.⁹ 2002). Tanto a COX-1 como a COX-2 formam um endoperóxido de prostaglandina instável, o PGH₂, a partir do ácido araquidônico. O PGH₂ é transformado por várias enzimas e também por mecanismos não-enzimáticos em tromboxano e nas séries de prostaglandinas D, F e I (figura 2), sendo estes compostos coletivamente conhecidos como prostanóides. A COX é, portanto, responsável pelos dois primeiros passos na síntese de prostanóides, sendo as etapas posteriores dependentes de enzimas tecido-específicas.

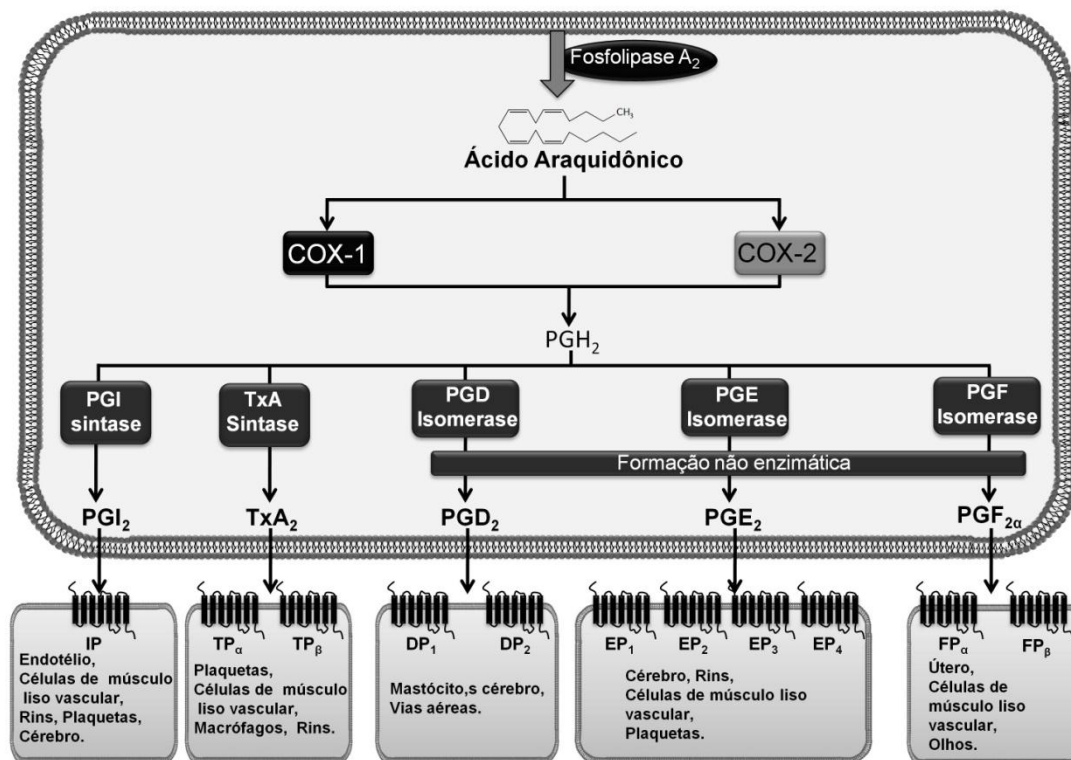


Figura 2: As vias da Ciclooxygenase (COX). Ácido araquidônico, as ciclooxygenases e seus subprodutos.

Nota: Adaptado de Grosser et al.⁵⁴ (2010).

Os prostanóides são importantes mediadores inflamatórios. Destacam-se as prostaglandinas PGE₂ e a PGI₂, por se apresentarem como potentes agentes vasodilatadores além de potencializarem o aumento de permeabilidade induzido por mediadores como bradicinina e histamina (Williams, Peck⁵⁵ 1977). Além disso, por esta potencialização do efeito da bradicinina e da histamina, estas PGs também estão envolvidas na hiperalgesia (Ferreira⁵⁶ 1972). Ainda, a PGE₂ que se encontra presente no estômago exerce importante papel protetor gástrico, uma vez que estimula a produção de muco pelas células caliciformes. Os prostanóides exercem seus efeitos através de receptores de superfície de membrana, acoplados a proteína G – para revisão ver Narumiya, FitzGerald⁵⁷ (2001) – ativando diferentes vias de sinalização intracelular.

No início da década de 70, Flower e Vane⁵⁸ (1972) demonstraram que o paracetamol era capaz de inibir a atividade da COX no cérebro com muito mais eficiência do que em outros tecidos. Este trabalho suportou a idéia de que há no cérebro uma variante da enzima COX, e que o paracetamol é um

inibidor seletivo desta enzima. Esta enzima foi identificada em córtex cerebral de cães e chamada de COX-3; trata-se, entretanto de um *splice* alternativo da COX-1 (Chandrasekharan et al.⁵⁹ 2002).

Os inibidores da COX, os antiinflamatórios não esteroidais (AINES), aliviam a dor, a febre e a inflamação através da inibição da formação de prostanóides (Grosser et al.⁶⁰ 2006), e são divididos em inibidores tradicionais (inibem a COX-1 e a COX-2) e inibidores seletivos para COX-2.

2.5 INIBIÇÃO SELETIVA DA CICLOOXIGENASE-2

As complicações gastrointestinais são reconhecidas como a principal limitação do uso crônico de antiinflamatórios não esteroidais. Estas complicações ocorrem principalmente em decorrência da inibição de prostanóides produzidos pela COX-1 e que são responsáveis pela citoproteção epitelial gástrica (Graham et al.⁶¹ 1993, Brzozowski et al.⁶² 2005). Desta forma, a demonstração da existência de uma segunda enzima, que diferente da COX-1 não parecia ser expressa constitutivamente nos tecidos, e cuja expressão era induzida por mediadores inflamatórios, gerou grande entusiasmo (Seibert et al.⁶³ 1995).

Diante dos novos fatos, foi sugerido que a COX-2 seria a principal, se não a única fonte de produção de prostaglandinas durante o processo inflamatório (Seibert et al.⁶³ 1995). Enquanto isso a COX-1, que é constitutivamente expressa em diversos tecidos, foi considerada a principal responsável por funções homeostáticas e a única isoforma envolvida na proteção da mucosa gastroduodenal (Brzozowski et al.⁶² 2005). Isto levou à hipótese de que a inibição seletiva da COX-2 apresentaria efeitos antiinflamatórios, analgésicos e antipiréticos, sem a toxicidade gastrointestinal dos antiinflamatórios tradicionais. Esta hipótese direcionou a busca e o desenvolvimento de fármacos seletivos para COX-2 (FitzGerald, Patrono⁶⁴ 2001).

Em 1999, menos de uma década após a descoberta da COX-2 (para uma revisão sobre a história da descoberta da COX-2 ver Hawkey⁶⁵ 2005), os primeiros inibidores seletivos da COX-2 (Coxibs), celecoxibe e rofecoxibe, entraram no mercado. Já em 2001, o volume de vendas de

rofecoxib atingiu US\$ 2,5 bilhões no mercado de 80 países, graças à vigorosa campanha de marketing (Mitchell, Warner⁶⁶ 2006, Patrono, Baigert⁶⁷ 2009, Grosser et al.⁵⁴ 2010). Lumiracoxibe e etoricoxibe surgiram como a segunda geração dos coxibs, conforme se observa no quadro 2 (Amer et al.⁶⁸ 2010).

Composto (nome comercial)	Ano de surgimento	Situação	Meia-vida (h)	T-máx (h)	Indicação
Rofecoxibe¹ (Vioxx)	1999	Retirado em 2004	17	2-3	Dor e artrite
Celecoxibe¹ (Celebrex)	1999	Disponível no mercado	12	2-4	Osteoartrite, artrite reumatóide, dor
Valdecoxibe¹ (Bextra)	2001	Retirado em 2005	8	2-3	Dor e artrite
Parecoxibe¹ (BextralMV- pró-droga valdecoxibe)	2001	Disponível para uso hospitalar	1/3	-	Impossibilidade de medicação oral
Etoricoxibe² (Arcoxia)	2002	Dose de 120 mg retirada em 2008	22	1	Artrite reumatóide, dor aguda, gota
Lumiracoxibe² (Prexige)	2005	Retirado em 2008	4	2-3	Artrite, osteoartrite, dismenorréia

Quadro 2: Inibidores seletivos da COX-2.

Nota: ¹fármacos de 1ª geração; ²fármacos de 2ª geração.

Apesar do grande e rápido sucesso dos Coxibs, com alguns deles ultrapassando bilhão de dólares em vendas por ano, logo se tornou aparente que a inibição seletiva da COX-2 era muito mais complexa do que sugerido pela simplista hipótese inicial.

A realização de ensaios clínicos controlados, mostrou que os Coxibs aumentam o risco de complicações cardiovasculares (Grosser et al.⁶⁰ 2006, Huber, Terezhalmay⁶⁹ 2006, Shi, Klotz⁷⁰ 2008, Chan et al.⁷¹ 2009)

afetando, por ano, aproximadamente de 1-2% de pacientes incluídos em ensaios controlados e randomizados. Estes dados levaram à retirada do rofecoxibe em 2004, seguido pelo valdecoxibe em 2005 (FitzGerald⁷² 2004). Estima-se que o rofecoxibe tenha causado quase 28 mil infartos do miocárdio e mortes súbitas nos Estados Unidos, entre 1999 e 2003 (Horton⁷³ 2004). Alguns estudos indicam ainda que juntos, o rofecoxibe e o celecoxibe tenham causado mais de 26 mil mortes nos cinco primeiros anos de sua liberação no mercado americano (Vaithianathan et al.⁷⁴ 2009).

Desde a retirada do rofecoxibe do mercado pela Merck em 2004, seguiu-se um caloroso debate na imprensa científica e popular sobre a utilização e segurança dos Coxibs (Fitzgerald⁷² 2004, Horton⁷³ 2004, Topol⁷⁵ 2004). Este caso trouxe à tona a deficiência que pode preceder a aprovação de um fármaco. A aprovação dos três primeiros Coxibs (celecoxibe, rofecoxibe e valdecoxibe) foi baseada em estudos clínicos de curta duração e com apenas algumas centenas de voluntários (Simon et al.⁷⁶ 1999, Lanza et al.⁷⁷ 1999, Langman et al.⁷⁸ 1999, Sikes et al.⁷⁹ 2002). A possibilidade de riscos cardiovasculares causada por estas drogas já tinha sido antecipada antes mesmo da aprovação dos primeiros representantes da classe (McAdam et al.⁸⁰ 1999, Catella-Lawson et al.⁸¹ 1999). Além disso, o aumento de risco cardiovascular com rofecoxibe já foi visível no estudo clínico inicial (Bombardier et al.⁸² 2000), e ainda assim ocorreram estudos posteriores que expuseram os pacientes a esse risco por tempo prolongado.

Atualmente no Brasil apenas o celecoxibe e o etoricoxibe são comercializados, ambos com retenção de receita médica e com clara indicação dos riscos de complicações cardiovasculares (Resolução - RDC nº 79⁸³). O Bextra (IMV) também é disponível, porém seu uso se limita ao ambiente hospitalar.

2.5.1 BASE BIOLÓGICA PARA COMPLICAÇÕES CARDIOVASCULARES RELATIVAS AOS INIBIDORES DAS CICLOOXIGENASES

Como descrito inicialmente, os prostanóides são uma família de mediadores lipídicos bioativos produzidos pela COX a partir do ácido araquidônico. A PGI₂, um dos prostanóides mais importantes no controle da

homeostasia do sistema cardiovascular, é um potente vasodilatador e, além disso, inibe a agregação plaquetária, a adesão de leucócitos e a proliferação de células de músculo liso vascular.

Portanto, a PGI_2 apresenta um efeito protetor no processo aterogênico. Os efeitos da PGI_2 contrastam com os efeitos do TXA_2 (figura 3), que causa agregação plaquetária, vasoconstrição e proliferação vascular (Huber, Terezhalmay⁶⁹ 2006). Assim o balanço entre o TXA_2 produzido pelas plaquetas e a PGI_2 produzida pelas células endoteliais é fundamental para saúde cardiovascular (Cheng et al.⁸⁴ 2002, Smyth, FitzGerald⁸⁵ 2002).

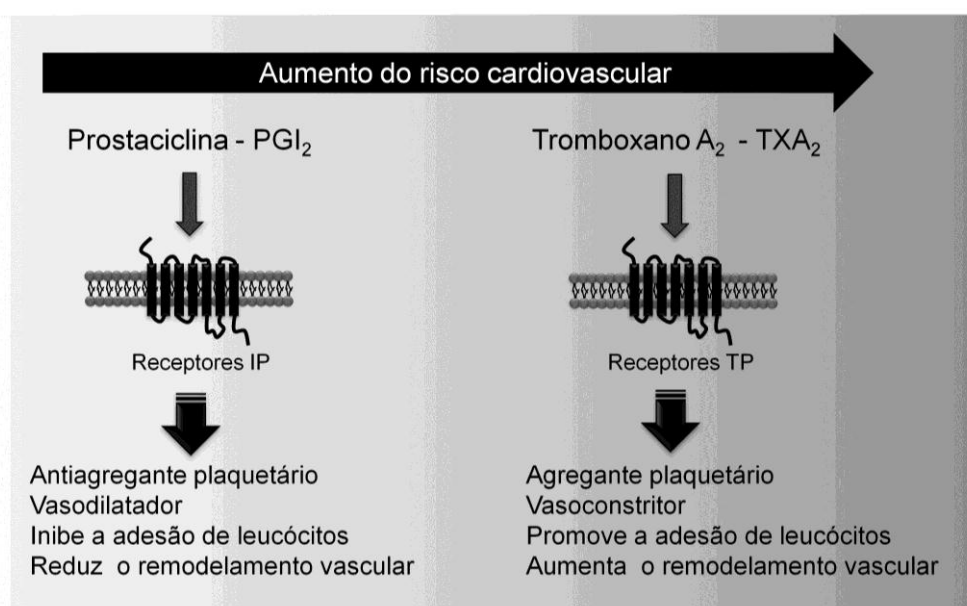


Figura 3: Efeitos vasculares da Prostaciclina (PGI_2) e do Tromboxano (TXA_2).

Nota: A Prostaciclina e o Tromboxano têm efeitos opostos no sistema cardiovascular.

Adaptado de Mitchell, Warner⁶⁶ (2006).

As primeiras evidências da importância do equilíbrio entre TXA_2 e PGI_2 surgiram de estudos com a aspirina. A aspirina inibe a COX-1 de forma irreversível, através da acetilação do sítio ativo da enzima. Diferente das células endoteliais que podem sintetizar uma nova enzima COX-1 em poucas horas, a plaqueta é desprovida de núcleo, sendo incapaz de repor as enzimas inibidas. Desta forma a aspirina inibe permanentemente a metabolização do ácido araquidônico pela COX-1 plaquetária. É importante lembrar ainda que a plaqueta não apresenta COX-2. Desta forma, doses regulares de aspirina causam uma inibição cumulativa e quase completa da COX-1 plaquetária afetando pouco a COX endotelial. Dito de outra forma, a aspirina reduz a

formação de TXA_2 pela plaqueta com mínimo efeito na produção de PGI_2 pelas células endoteliais. Este deslocamento da produção em favor da PGI_2 gera um ambiente antitrombótico, já bem documentado. A utilização diária de baixas doses de aspirina em pacientes de risco reduz a ocorrência de eventos trombóticos (Nyman et al.⁸⁶ 1992).

De acordo com a hipótese inicial de que a COX-2 não está presente nos tecidos de forma constitutiva, sendo expressa somente durante o desenvolvimento de uma resposta inflamatória, é lógico imaginar que em indivíduos que não apresentem inflamação vascular os inibidores seletivos desta enzima não afetam o equilíbrio entre TXA_2 e PGI_2 .

Entretanto logo ficou evidente que a COX-2 não era expressa somente durante a inflamação, mas podia estar presente em vários tecidos durante condições fisiológicas (Bishop-Bailey et al.⁸⁷ 2006), inclusive em células vasculares (Grosser et al.⁶⁰ 2006). Estudos em voluntários saudáveis mostram que os inibidores seletivos da COX-2 reduzem a formação da prostaciclina (PGI_2) (McAdam et al.⁸⁰ 1999, Catella-Lawson et al.⁸¹ 1999). Em conjunto com outros estudos (Fries et al.⁸⁸ 2006, Schwartz et al.⁸⁹ 2007), estes dados indicam que 60-70% da produção da PGI_2 em humanos saudáveis é derivada da COX-2. Desta forma a COX-2 seria a isoforma da COX predominante no endotélio vascular, e diretamente relacionada com a produção de prostaciclina na circulação normal. Esta visão é diferente da hipótese inicial em que a COX-2 seria expressa somente durante a inflamação. Corroborando esta idéia alguns trabalhos têm mostrado que o estresse de cisalhamento (*shear stress*), que é constantemente criado pela pressão e movimento do sangue dentro do lúmen vascular, pode gerar a expressão de COX-2 (Topper et al.⁹⁰ 1996, Inoue et al.⁹¹ 2002). Isto explicaria a ausência de COX-2 em células endoteliais em cultura (Mitchell et al.⁹² 1993), já que estas células não estão expostas a este estresse mecânico.

Mas apesar das evidências citadas acima, indicando que a COX-2 possa ser uma enzima expressa constitutivamente nas células endoteliais, estes achados não são uniformes. Inúmeros estudos utilizando imunohistoquímica têm mostrado que vasos de pessoas saudáveis expressam COX-1, com mínima evidência de COX-2 constitutivamente expressa (Baker et al.⁹³ 1999, Schönbeck et al.⁹⁴ 1999, Stemme et al.⁹⁵ 2000).

Se por um lado não há evidências consistentes da expressão constitutiva da COX-2 em vasos saudáveis, em lesões ateroscleróticas parece não haver dúvida de que há uma indução na expressão de COX-2. Interessantemente, a excreção urinária de metabólitos da PGI₂ aumenta em pacientes com síndrome coronária aguda (FitzGerald et al.⁹⁶ 1984) ou logo após uma intervenção vascular (Roy et al.⁹⁷ 1985), o que pode ser interpretado como um mecanismo de defesa vascular para prevenir eventos trombóticos. Corroborando esta idéia, seguidos trabalhos mostraram a expressão de COX-2 em lesões ateroscleróticas (Schönbeck et al.⁹⁸ 1999, Belton et al.⁹⁹ 2000, Stemme et al.⁹⁵ 2000). As plaquetas não expressam COX-2, então como previsto, os inibidores de COX-2 não inibem a produção de TXA₂ pelas plaquetas. A conclusão a partir destas observações é que a inibição da produção de PGI₂ a partir da COX-2 pode gerar um desequilíbrio na relação entre TXA₂ e PGI₂, aumentando desta forma a probabilidade de um evento trombótico (figura 4).

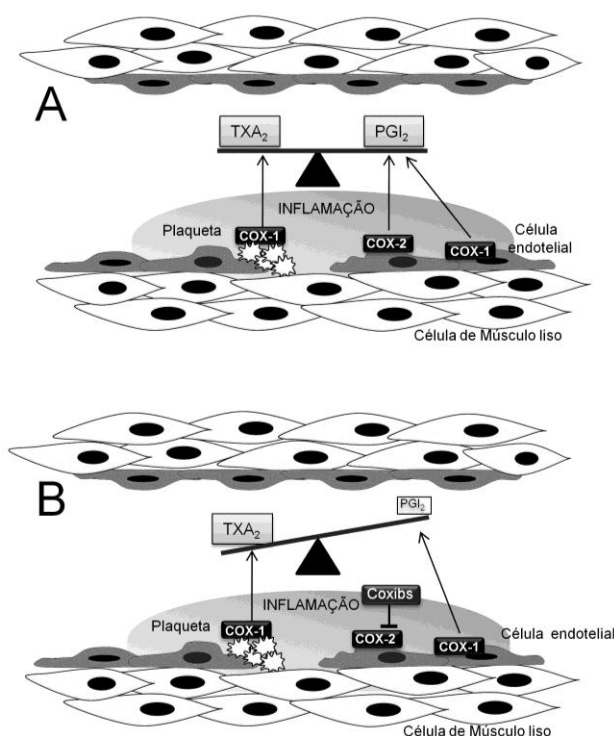


Figura 4: Balanço entre mediadores pró-aterogênicos e anti-aterogênicos.

Nota: Em um estado normal a produção de PGI₂ é predominantemente dependente de COX-1. Entretanto em uma situação de lesão vascular, a expressão de COX-2 é induzida nas células endoteliais passando a contribuir para a produção de PGI₂ (Painel A), opondo-se aos efeitos aterogênicos do TXA₂ produzido pela COX-1 das plaquetas. A utilização de anti-inflamatórios seletivos para COX-2 (Coxibs) pode reduzir a produção de PGI₂ gerando um desbalanço entre TXA₂ e PGI₂ (Painel B).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Os inibidores seletivos de COX-2 como etoricoxibe, têm sido utilizados com sucesso para o tratamento da dor e inflamação em alguns pacientes com periodontite. Entretanto, o efeito destes fármacos sobre variáveis cardiovasculares tem sido negligenciado.

Espera-se com este projeto obter uma compreensão das implicações cardiovasculares relativas ao tratamento com inibidores seletivos da COX-2 em um modelo experimental de periodontite; e desta maneira, compreender a relação entre doença periodontal, inibição seletiva da COX-2 e disfunção endotelial. Os dados obtidos poderão fornecer evidências iniciais, bem como orientar estudos futuros para que se obtenha clareza em relação à segurança da utilização destes fármacos no tratamento da periodontite.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Avaliar o efeito da inibição seletiva da COX-2, através do etoricoxibe, sobre a reatividade vascular de animais com periodontite induzida por ligadura, através de dois agentes vasoconstritores (fenilefrina e angiotensina II) e de dois agentes vasodilatadores (acetilcolina e nitroprussiato de sódio);
- ❖ Analisar o efeito da periodontite e da inibição seletiva da COX-2, através do etoricoxibe, sobre o aumento de frequência cardíaca induzida pela isoprenalina;
- ❖ Investigar a alteração provocada pela periodontite e pela inibição seletiva da COX-2, com o etoricoxibe, na pressão arterial média e na frequência cardíaca dos animais;
- ❖ Verificar o efeito da periodontite e do uso do etoricoxibe sobre a produção de óxido nítrico;
- ❖ Analisar histologicamente o impacto da periodontite e do uso do etoricoxibe sobre o tecido cardíaco de ratos infartados (figura 5).

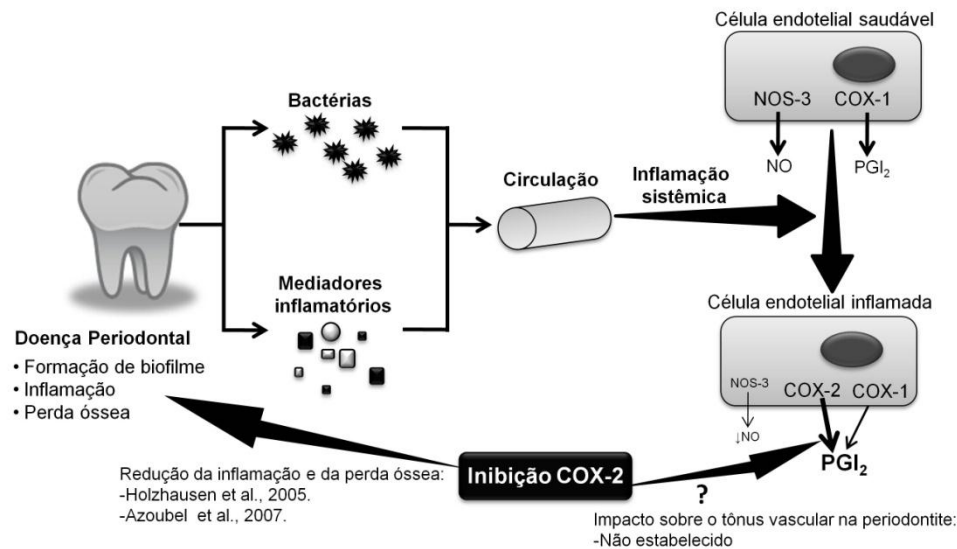


Figura 5: Representação esquemática da idéia e objetivos centrais do trabalho - Efeito da inflamação sistêmica decorrente da periodontite sobre a célula endotelial.

Nota: A inflamação sistêmica induzida pela microbiota presente na doença periodontal contribui para o desenvolvimento de disfunção endotelial com conseqüente redução na produção de óxido nítrico (NO). Entretanto a inflamação sistêmica pode também levar ao aumento da produção de COX-2 na célula endotelial. A COX-2 pode apresentar um importante papel nesta situação, contrabalanceando a redução na produção de NO através da produção de prostaciclina (PGI₂), que também tem importante papel na vasodilatação e inibição da agregação plaquetária. Diante desta visão há questionamentos sobre os efeitos cardiovasculares de inibidores seletivos da COX-2 na periodontite.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERÍSTICA DA AMOSTRA

Para este trabalho foram utilizados ratos Wistar adultos, de 2 a 3 meses de idade, com a média de massa corpórea inicial de 250 g. Trabalhou-se com oito ratos por grupo e os animais foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os mesmos foram mantidos, durante todo o período do experimento, em ambiente com temperatura de 22 ± 2 °C e ciclo de claro/escuro (12/12h) controlados automaticamente, bem como tiveram livre acesso à água e comida. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEPG (Anexo A) e os animais foram manipulados conforme recomendações da SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório).

4.2 INDUÇÃO DA PERIODONTITE ATRAVÉS DE LIGADURAS

Para o procedimento de colocação das ligaduras, os ratos foram anestesiados e sedados com uma combinação de 25 µL de quetamina (75 mg/Kg) e 25 µL de xilazina (15 mg/Kg), injetados via intraperitoneal. Os animais foram posicionados em um aparato de Doku, a fim de que permanecessem com a boca aberta para a colocação das ligaduras. Para as ligaduras, usou-se fio de algodão (Tex 34 Glacê 50 – Lipasa – Brasil). Os dentes dos animais foram levemente luxados com o auxílio de uma sonda exploradora, para criar um espaço para a colocação das ligaduras. As ligaduras foram colocadas nos primeiros molares inferiores e segundos molares superiores, bilateralmente (figura 6), atentando-se para que as ligaduras ficassem posicionadas dentro do sulco gengival, com o nó na face mesial dos molares inferiores e na face palatina dos molares superiores (Llavaneras et al.¹⁰⁰ 2001, Achong et al.¹⁰¹ 2003, Galvão et al.¹⁰² 2003, Buduneli et al.¹⁰³ 2004). As ligaduras foram colocadas bilateralmente a fim de se evitar qualquer possível distúrbio no padrão mastigatório do animal (Dumitrescu et al.¹⁰⁴ 2004). Os animais do grupo falso-operado foram submetidos aos mesmos procedimentos, porém o nó não foi realizado e a ligadura foi imediatamente removida.

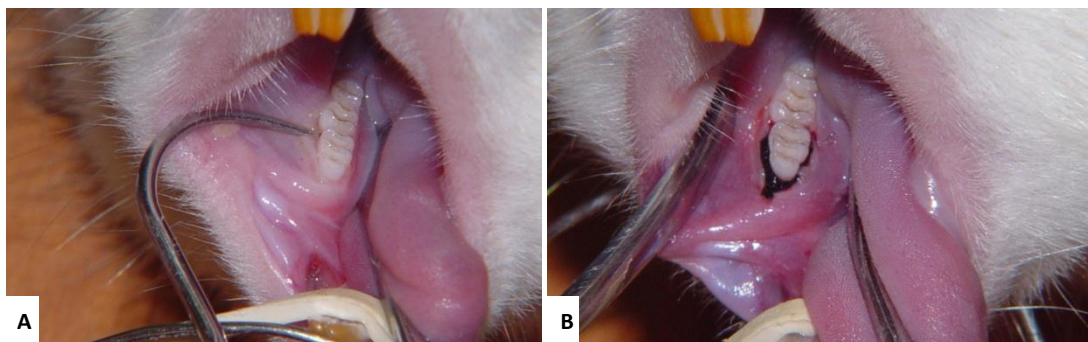


Figura 6: Colocação das ligaduras nos ratos. A: dente sendo luxado com o auxílio de sonda exploradora a fim de se criar espaço para colocação da ligadura. B: colocação da ligadura finalizada.

4.3 ADMINISTRAÇÃO DA MEDICAÇÃO

A medicação administrada foi o etoricoxibe 90 mg (Arcoxia® - Merck Sharp & Dohme). O comprimido foi triturado manualmente com o auxílio de um pistilo e um pote dappen, e diluído em água destilada na concentração de 10 mg/kg. A solução preparada foi administrada via oral, por meio de gavagem, diariamente a partir do dia 14 do experimento até o dia 20. Os grupos veículo receberam água destilada também através de gavagem.

4.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS VASCULARES

Os animais foram anestesiados e sedados com uma combinação de 25 µl de quetamina (75 mg/Kg) e 25 µl de xilazina (15 mg/Kg), injetados via intramuscular. Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida (temperatura entre 35 e 36° C). A veia femoral foi localizada e então foi feita a inserção de uma agulha acoplada a uma cânula de polietileno (PE 50) e seringa. Esse acesso venoso serviu para administração dos compostos que foram utilizados nos estudos. Na sequência, a artéria carótida esquerda foi localizada e, de forma cuidadosa e rápida, separada do nervo vago e tecidos adjacentes. Foi realizada então, a inserção de um catéter de polietileno (Angiocath®, número 19), devidamente heparinizado, o qual foi firmemente amarrado na artéria e conectado a um transdutor de pressão acoplado ao PowerLab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Os valores de pressão arterial média, sistólica e

diastólica (em mmHg) e da frequência cardíaca (em batimentos por minuto, bpm) foram registrados em um computador por um software de integração (ChartPro7®). Após um período de 30 minutos de estabilização, a reatividade vascular para fenilefrina, angiotensina II, isoprenalina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio foi avaliada através da injeção (subseqüente) de três doses crescentes de cada um destes compostos (3, 10 e 30 nmol/kg para fenilefrina; 3, 10 e 30 pmol/kg para angiotensina II; 0,1, 0,3 1,0 nmol/kg para isoprenalina; 3, 10 e 30 nmol/kg para acetilcolina e nitroprussiato de sódio). Ao final do experimento os animais foram sacrificados por sobredose anestésica – quetamina e xilazina.

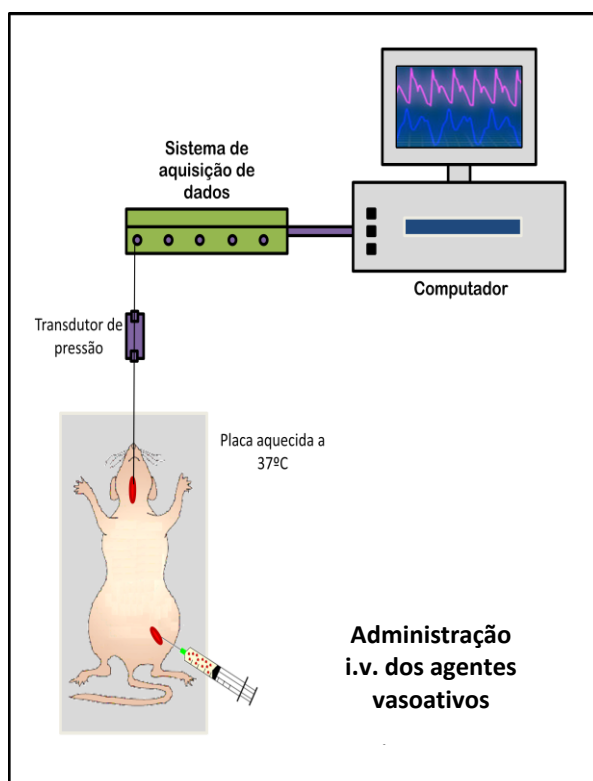


Figura 7: Representação do preparo animal para avaliação dos parâmetros cardiovasculares e administração dos agentes vasoativos.

Nota: Acesso na carótida esquerda e conexão ao transdutor de pressão; acesso à veia femoral para administração de fenilefrina, angiotensina II, isoprenalina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio.

As figuras que seguem representam os registros típicos após administração de fenilefrina e angiotensina II (figura 8), isoprenalina (figura 9), acetilcolina (figura 10) e nitroprussiato de sódio (figura 11).

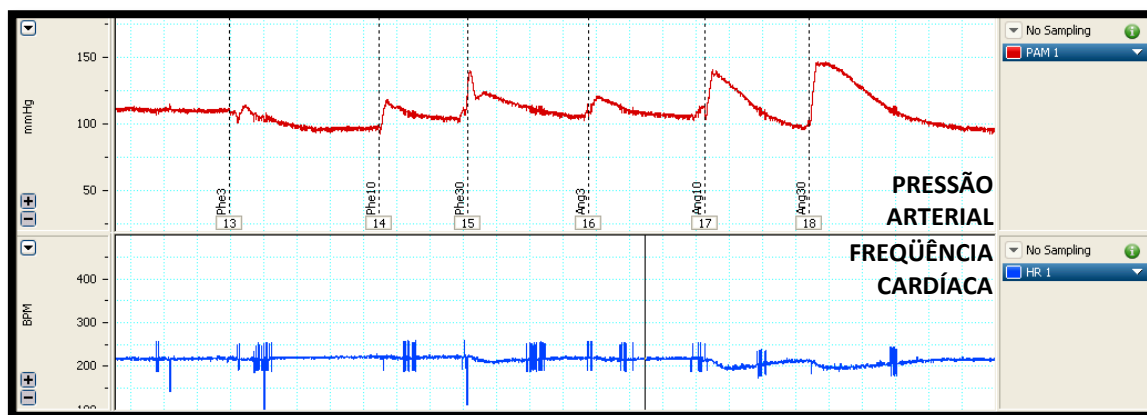


Figura 8: Registro típico das alterações na pressão arterial média e frequência cardíaca induzidas pela fenilefrina e pela angiotensina II.

Nota: Administração das três doses crescentes de fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/kg) e angiotensina II (3, 10 e 30 pmol/kg).

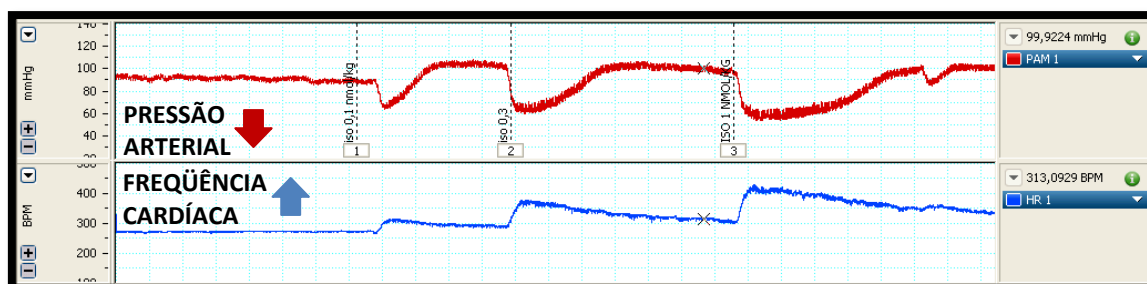


Figura 9: Registro típico das alterações na pressão arterial e na frequência cardíaca induzidas pela isoprenalina.

Nota: Administração das três doses crescentes de isoprenalina (0,1, 0,3 1,0 nmol/kg).

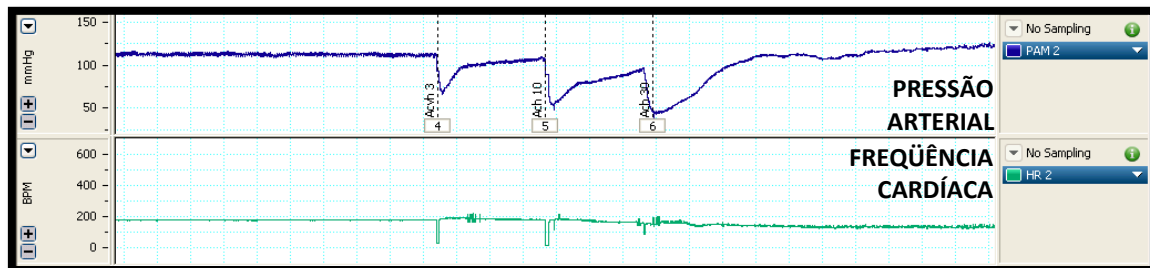


Figura 10: Registro típico das alterações na pressão arterial média e frequência cardíaca induzidas pela acetilcolina.

Nota: Administração das três doses crescentes de acetilcolina (3, 10 e 30 nmol/kg).

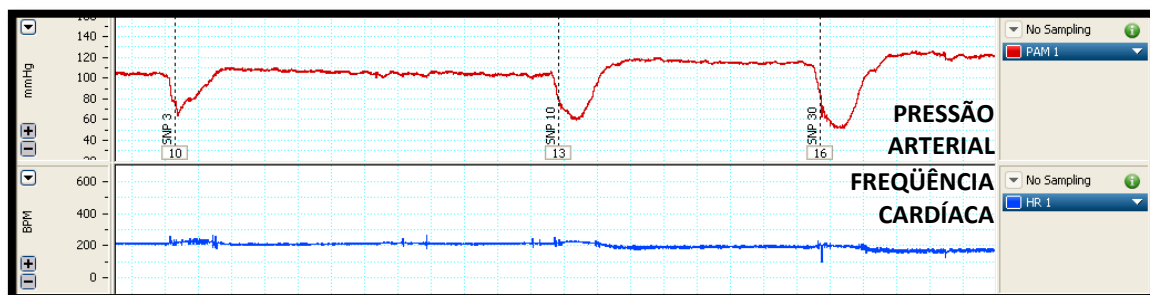


Figura 11: Registro típico das alterações na pressão arterial média e frequência cardíaca induzidas pelo nitroprussiato de sódio.

Nota: Administração das três doses crescentes de nitroprussiato de sódio (3, 10 e 30 nmol/kg).

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO E NITRATO (NO_x)

O óxido nítrico (NO) é um potente vasodilatador de veias e artérias que se encontra reduzido durante a periodontite (Higashi et al.²⁹ 2008); é um mediador primordial para o relaxamento do endotélio e manutenção do tônus vascular. O uso de antiinflamatórios, como o etoricoxibe (Behal et al.¹⁰⁵ 2009), pode estar associado a um aumento na produção de óxido nítrico em animais (Lv et al.¹⁰⁶ 2007).

A metodologia utilizada para a quantificação dos valores de NO_x já foi descrita detalhadamente (Granger et al.¹⁰⁷ 1990). Basicamente, o plasma foi diluído 1:1 com água bidestilada e desproteinizado pela adição de sulfato de zinco (2%). Para a conversão do nitrato para nitrito, as amostras foram incubadas a 37° C durante 2 horas, em presença da nitrato redutase expressa em *Escherichia coli* cultivada em anaerobiose. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas para a remoção da bactéria, sendo 100 µl do sobrenadante misturados com o mesmo volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de alfa-naftil-etilenodiamina em água bidestilada) em placas de 96 poços para leitura a 540 nm num leitor de placas (leitor de ELISA). Curvas padrão de nitrito e nitrato (0 a 150 µM) foram realizadas simultaneamente. Como nestas condições a conversão de nitrato para nitrito foi sempre maior que 90%, não foi realizada nenhuma correção dos resultados. Finalmente, por meio de regressão linear, os valores foram expressos como µM de NO_x (nitrato e nitrito).

4.6 AVALIAÇÃO DA REABSORÇÃO ÓSSEA PERIODONTAL

Após sacrifício dos animais através de sobredose anestésica – quetamina e xilazina – a mandíbula (primeiro molar) e maxila (segundo molar) foram retiradas para análise da perda óssea induzida pela ligadura e, portanto caracterização da periodontite.

Exame morfométrico: após a retirada do tecido gengival da região das hemi-mandíbulas e maxilas, a parte óssea subjacente foi submetida a procedimento de fervura em água por 30 minutos, com posterior imersão das amostras em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 10v ou 3% por 12 horas. Depois

das amostras estarem bem secas, estas foram imersas e imediatamente removidas de solução de azul de metileno (1 g/100 mL), para delinear a linha da junção cimento-esmalte. O método utilizado para quantificar a perda óssea periodontal foi adaptado de Björnsson et al.¹⁰⁸ (2003). As amostras foram fotografadas em Câmera Digital Sony Cybershot DSC 707, 5.0, Sony Brasil Ltda, salvas em um computador e as medidas – das regiões linguais e vestibulares das mandíbulas e das maxilas – foram entre a junção cimento-esmalte e a crista de óssea alveolar. As imagens foram analisadas pelo programa Image-Pro Plus® Version 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Foram consideradas cinco medidas lineares para cada face dos dentes inferiores e três medidas lineares para cada face dos dentes superiores, conforme figura 12.

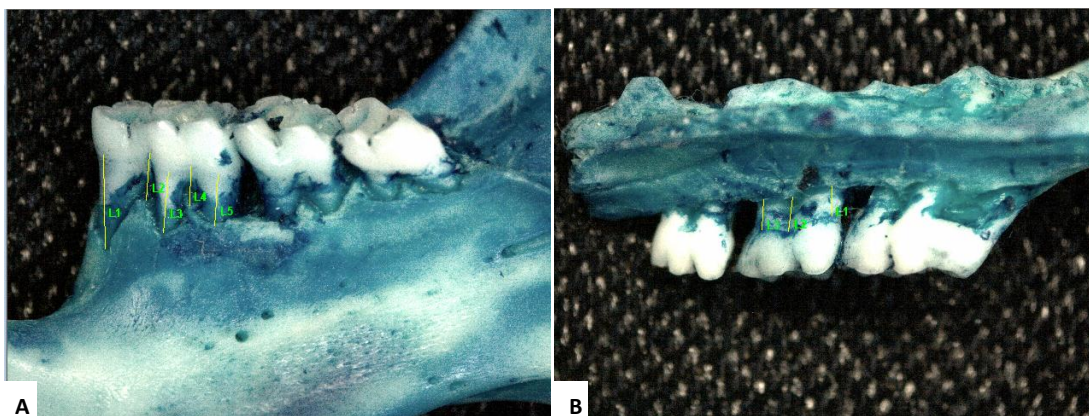


Figura 12: Maxilares preparados para mensuração da perda óssea.

Nota: Mandíbula (A) e maxila (B) com suas respectivas marcações lineares a fim de se mensurar a perda óssea alveolar média (em mm) dos animais.

4.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO CORAÇÃO PÓS-INFARTO

Com o intuito de se estudar o processo inflamatório no músculo cardíaco, lesões miocárdicas foram induzidas nos animais através da administração de isoprenalina (80 mg/kg, s.c.) por dois dias consecutivos, de acordo com o modelo previamente estabelecido por Rona et al.¹⁰⁹ (1959). A diferença entre a demanda e a oferta de oxigênio promove uma lesão miocárdica isquêmica com características semelhantes ao infarto do miocárdio (Rona et al.¹⁰⁹ 1959).

Os ratos receberam ligaduras ou passaram pela falsa-cirurgia, bem como foram medicados com etoricoxibe ou veículo. Nos dias 20 e 21 receberam doses subcutâneas de isoprenalina (80 mg/kg, s.c.) para indução do infarto. No dia 22, os ratos foram anestesiados e sedados com uma combinação de 25 µL de quetamina (75 mg/Kg) e 25 µl de xilazina (15 mg/Kg), injetados via intraperitoneal, e então foram sacrificados através de exsanguinação. Seqüencialmente, tiveram seus corações removidos e os mesmos foram irrigados com solução fisiológica a fim de se remover o remanescente sanguíneo ainda presente e evitar a perfusão cardíaca para melhor preservação do tecido a ser analisado.

Amostras dos corações foram fixadas em solução ALFAC (85% de etanol 80%, 10% de formol 40% e 5% de ácido acético glacial). Foi realizado um corte longitudinal com lâmina de bisturi na região de ventrículo esquerdo, e as amostras foram desidratadas e emblocadas em parafina. Os blocos foram seccionados em cortes de 5 µm e esticados em lâminas. Os cortes foram hidratados em xilol, seguido por seqüência decrescente de etanol, finalizando com coloração em hematoxilina e eosina. Para analisar alterações presentes no tecido cardíaco, as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico e receberam escores (1, 2 e 3) quanto à presença do infiltrado inflamatório. Sendo 1 – pouco presente, 2 – moderadamente presente e 3 – muito presente.

4.8 COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS

As seguintes substâncias foram utilizadas neste estudo:

- ❖ Ácido acético glacial e álcool etílico absoluto (comprados da Rivax, Ponta Grossa, PR, Brasil);
- ❖ Angiotensina II, fenilefrina, acetilcolina, nitroprussiato de sódio e isoprenalina (todos comprados da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA);
- ❖ Quetamina (Parke-Davis, São Paulo, SP, Brasil);
- ❖ Etoricoxibe (Arcoxia® - Merck Sharp & Dohme);

- ❖ Hematoxilina, eosina, azul de metileno e xilol (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil);
- ❖ Heparina sódica (doada pela Cristália Produtos Farmacêuticos, São Paulo, SP);
- ❖ Xilazina (RonpumTM, Bayer; São Paulo, SP, Brasil).

Os sais e reagentes utilizados para preparo de soluções foram dissolvidos em água destilada. Os estoques de angiotensina II foram preparados em HCl (0,01 N). Todos os compostos foram diluídos para uso em PBS estéril.

4.9 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

No dia 0, os ratos utilizados para o experimento foram randomizados. Metade dos animais recebeu ligaduras para indução da periodontite, e a outra metade foi submetida à falsa-cirurgia (as ligaduras foram colocadas e imediatamente removidas). No dia 14, quando se iniciou o tratamento farmacológico e cuja duração foi de sete dias, houve nova randomização, e os animais foram divididos nos cinco seguintes grupos:

- ❖ *Naive*: grupo não submetido a nenhum procedimento;
- ❖ Ligadura + etoricoxibe: os ratos receberam ligaduras e foram tratados com etoricoxibe;
- ❖ Ligadura + veículo: os ratos receberam ligaduras e foram tratados com água destilada;
- ❖ Falso-operado + etoicoxibe: os ratos foram submetidos à falsa-cirurgia e tratados com etoricoxibe;
- ❖ Falso-operado + veículo: os ratos foram submetidos à falsa-cirurgia e tratados com água destilada.

Ao vigésimo primeiro dia, os animais foram preparados para análise dos parâmetros cardiovasculares (resposta a agentes vasoconstritores, pressão arterial média e frequência cardíaca). Foi realizada coleta de sangue para posterior quantificação de óxido nítrico, e então os animais foram sacrificados. Após sacrifício através de sobredose anestésica – quetamina e xilazina – tiveram suas mandíbulas e maxilas removidas para mensuração da perda óssea alveolar (figura 13).

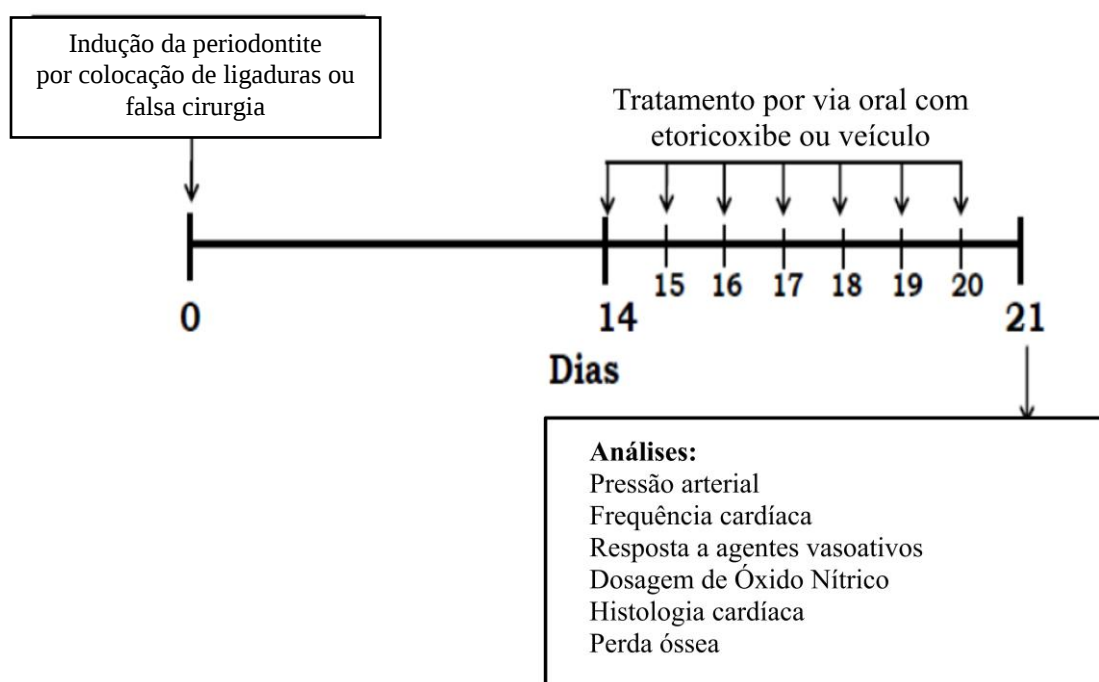


Figura 13: Representação cronológica do experimento.

A fim de se verificar a eficácia da técnica de ligaduras como modelo experimental de periodontite, bem como a absorção e efetividade do etoricoxibe na dose utilizada, foi realizado um experimento com tratamento precoce de etoricoxibe. As ligaduras foram colocadas no dia 0 e o tratamento com etoricoxibe ou veículo se iniciou no dia 1. O tratamento ocorreu diariamente, por 6 dias, também na dose de 10 mg/kg, e ao sétimo dia os animais foram sacrificados e tiveram suas maxilas e mandíbulas removidas para mensuração da perda óssea alveolar (figura 14).

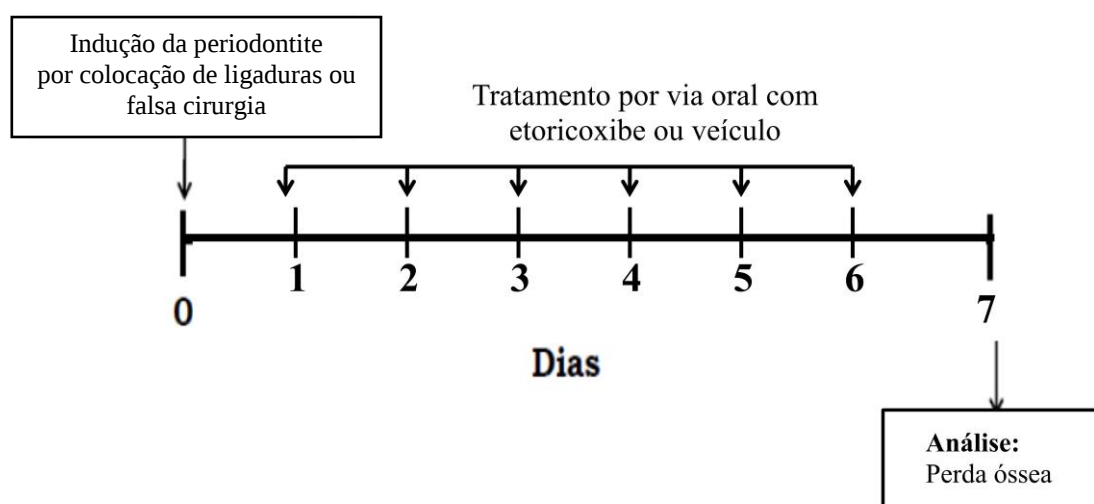


Figura 14: Representação cronológica do experimento com inibição precoce da COX-2.
Nota: Para caracterização da periodontite e da absorção e efetividade do etoricoxibe.

A fim de se analisar possíveis alterações no tecido cardíaco dos animais, foi realizado um experimento semelhante ao ilustrado na figura 13, porém com o diferencial de que os animais receberam doses subcutâneas de isoprenalina, na concentração de 80 mg/kg, nos dias 19 e 20; sendo sacrificados para coleta do coração no dia 21 (figura 15).

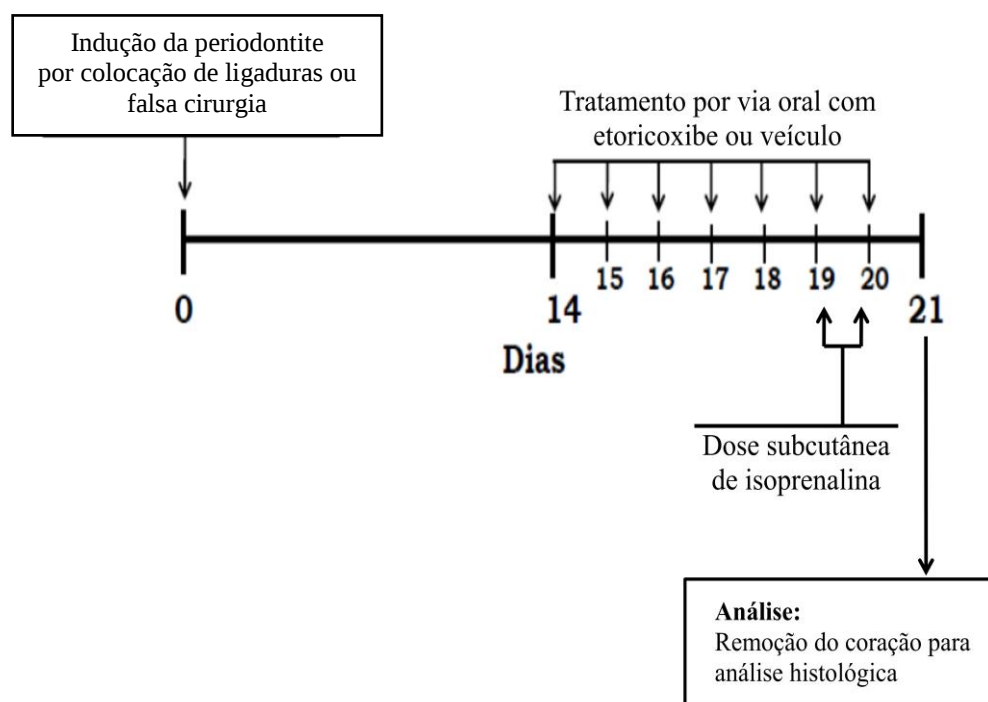


Figura 15: Representação cronológica do experimento para análise histológica cardíaca.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média $\pm$ S.E.M. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias) seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. O nível de significância aceito para os testes foi de $P < 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPad Prism versão 5.01, San Diego, Califórnia, EUA.

5 RESULTADOS

5.1 PERDA ÓSSEA ALVEOLAR MÉDIA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO PRECOCE DA COX-2 – CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO ETORICOXIBE

A fim de confirmar o efeito do etoricoxibe sobre a perda óssea decorrente da periodontite, realizou-se um experimento que seguiu o protocolo representado pela figura 14. Como pode ser verificado na figura 16, há uma perda óssea significativa no sétimo dia após a colocação das ligaduras, caracterizando a periodontite já neste período.

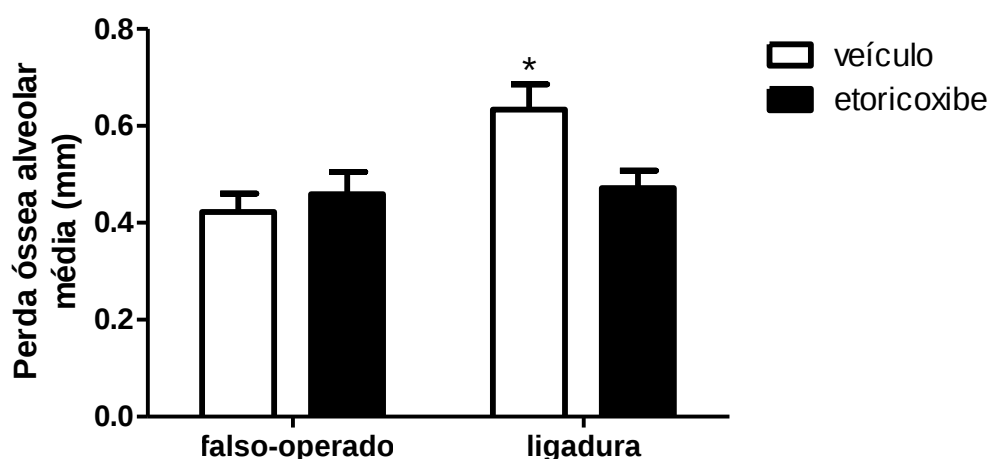


Figura 16: Representação da perda óssea alveolar média em um modelo de periodontite com inibição precoce da COX-2.

Nota: Efeito do tratamento precoce com etoricoxibe sobre perda óssea alveolar média (mm) do segundo molar superior direito em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia. Os animais foram tratados com etoricoxibe (10 mg/kg, v.o.) ou veículo (água, 100 µL/100 g, v.o.) a partir do segundo dia após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia. Após sete dias de tratamento, os animais foram sacrificados e tiveram suas maxilas removidas para mensuração da perda óssea alveolar. As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 6 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (* $p < 0,05$, em relação aos demais grupos)

Obs.: O mesmo se aplica aos demais dentes que receberam ligaduras ou passaram pela falsa-cirurgia – primeiro molar inferior direito e segundos molares superiores (direito e esquerdo).

5.2 PERDA ÓSSEA ALVEOLAR MÉDIA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO TARDIA DA COX-2

Uma vez caracterizada a eficácia do etoricoxibe no modelo de periodontite induzida por ligadura, passamos a avaliar o efeito deste fármaco sobre parâmetros cardiovasculares em momentos mais tardios da periodontite. Para isso, a partir do décimo quarto dia de experimento, os animais receberam etoricoxibe (10 mg/kg, v.o.) por sete dias. No vigésimo primeiro dia, tiveram suas mandíbulas e maxilas removidas para quantificação da perda óssea alveolar nos diferentes grupos. Nota-se que o tratamento com etoricoxibe, quando iniciado após 14 dias da colocação das ligaduras, não interfere na perda óssea alveolar média dos animais. Não há diferença entre a perda óssea observada nos ratos com ligaduras que receberam etoricoxibe para com aqueles que receberam veículo (figura 17).

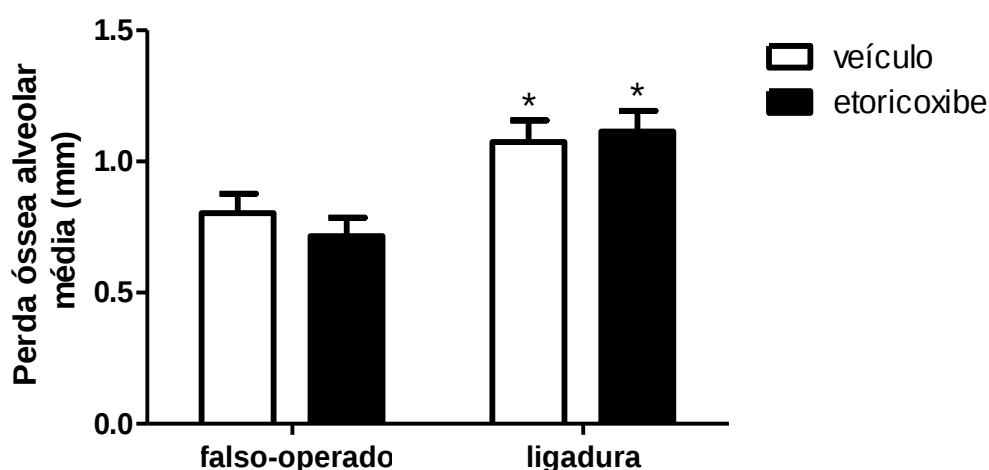


Figura 17: Representação da perda óssea alveolar média.

Nota: Efeito do etoricoxibe sobre perda óssea alveolar média (mm) do primeiro molar inferior esquerdo em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia. Os animais foram tratados com etoricoxibe (10 mg/kg, v.o.) ou veículo (água, 100 µL/100 g, v.o.) a partir do décimo quarto dia após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia. Após sete dias de tratamento os animais foram preparados para avaliação dos parâmetros cardiovasculares; após sacrifício, tiveram suas mandíbulas removidas para mensuração da perda óssea alveolar. As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 8 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias via seguida pelo post hoc de Bonferroni. (* $p < 0,05$, em relação aos grupos falso-operados)

Obs.: O mesmo se aplica aos demais dentes que receberam ligaduras ou passaram pela falsa-cirurgia – primeiro molar inferior direito e segundos molares superiores (direito e esquerdo).

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO E NITRATO (NO_x) EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO TARDIA DA COX-2

Como mostra a figura 18, os animais do grupo ligadura apresentaram considerável redução de NO_x. O etoricoxibe aumentou a quantificação de NO_x tanto no grupo ligadura como no grupo falso-operado.

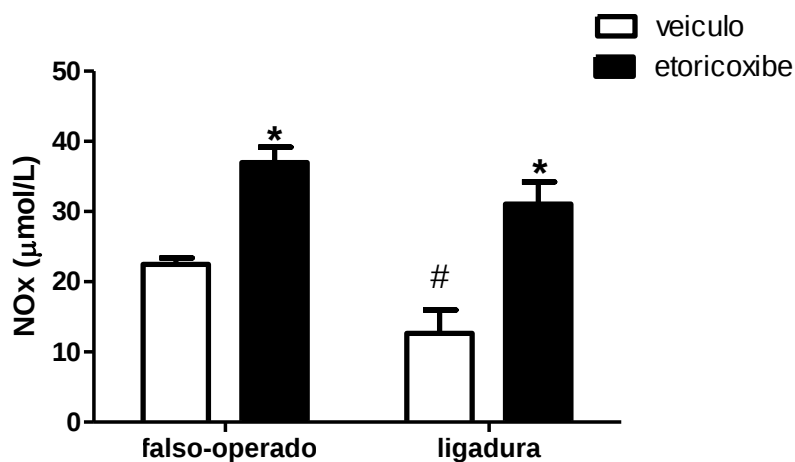


Figura 18: Efeito do etoricoxibe sobre a concentração plasmática de NO_x (μmol/L) em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.

Nota: Os animais foram tratados com etoricoxibe (10 mg/kg, v.o.) ou veículo (água, 100 μL/100 g, v.o.) a partir do décimo quarto dia após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia. Após sete dias de tratamento os animais tiveram seu sangue coletado para posterior obtenção do plasma e quantificação de nitrito e nitrato. As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 8 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (* $p < 0,05$, em relação ao respectivo grupo veículo, # $p < 0,05$, em relação ao grupo falso-operado veículo)

5.4 HEMOGRAMA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO TARDIA DA COX-2

Através da coleta sanguínea, além da quantificação de NO_x também foi realizada a dosagem dos componentes sanguíneos.

Tabela 1: Quantificação dos componentes sanguíneos dos respectivos grupos experimentais

COMPONENTES SANGÜÍNEOS	Falso-operado + veículo	Falso-operado + etoricoxibe	Ligadura + veículo	Ligadura + etoricoxibe
Leucócitos (K/μL)	6,8 ± 1,8	5,1 ± 1,8	5,5 ± 5,5	5,7 ± 1,5
Plaquetas (K/μL)	416,8 ± 75,1	425,0 ± 196,9	378,5 ± 157,1	564,0 ± 118,0
Eritrócitos (K/μL)	5,9 ± 1,1	6,5 ± 1,3	6,6 ± 0,9	6,1 ± 0,7
Granulócitos (%)	43,3 ± 21,2	44,0 ± 15,7	46,3 ± 10,5	33,5 ± 13,4
Hemoglobina (g/dL)	14,2 ± 2,3	15,1 ± 1,5	15,2 ± 0,8	14,1 ± 0,3

Nota: os dados representam a média ± desvio padrão dos respectivos valores de 8 animais.

5.5 PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO TARDIA DA COX-2

Em seguida avaliamos o efeito da inibição seletiva da COX-2 em animais com periodontite sobre a resposta vasodilatadora a dois diferentes agentes, acetilcolina e nitroprussiato de sódio, e sobre a resposta vasoconstritora também a dois diferentes agentes, fenilefrina e angiotensina II.

Estatisticamente, a resposta à acetilcolina se manteve inalterada, porém foi observada uma tendência do grupo ligadura que recebeu etoricoxibe em apresentar menor vasodilatação (figura 19).

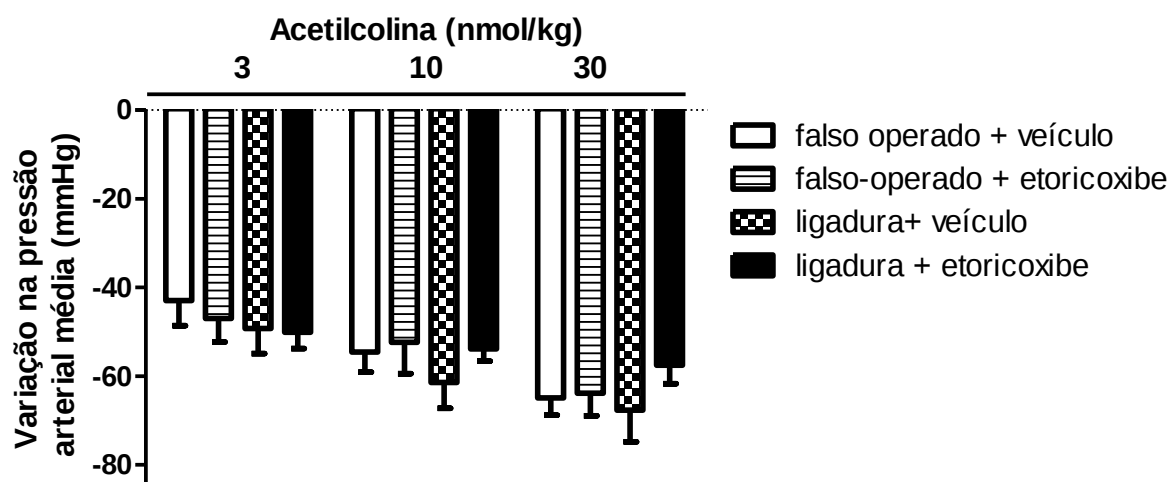


Figura 19: Efeito do etoricoxibe sobre a queda de pressão arterial média (mmHg) induzida pela acetilcolina em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.

Nota: Os animais foram tratados com etoricoxibe (10 mg/kg, v.o.) ou veículo (água, 100 µL/100 g, v.o.) a partir do décimo quarto dia após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia. Após sete dias de tratamento os animais foram preparados para registro da pressão arterial. Doses crescentes de acetilcolina foram injetadas (i.v.) e a variação na pressão arterial média foi registrada. As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 8 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. ($p > 0,05$)

Na sequência, foi avaliada a resposta vasodilatadora dos animais a nitroprussiato de sódio (figura 20). Não foram observadas alterações com significância estatística dentre os grupos.

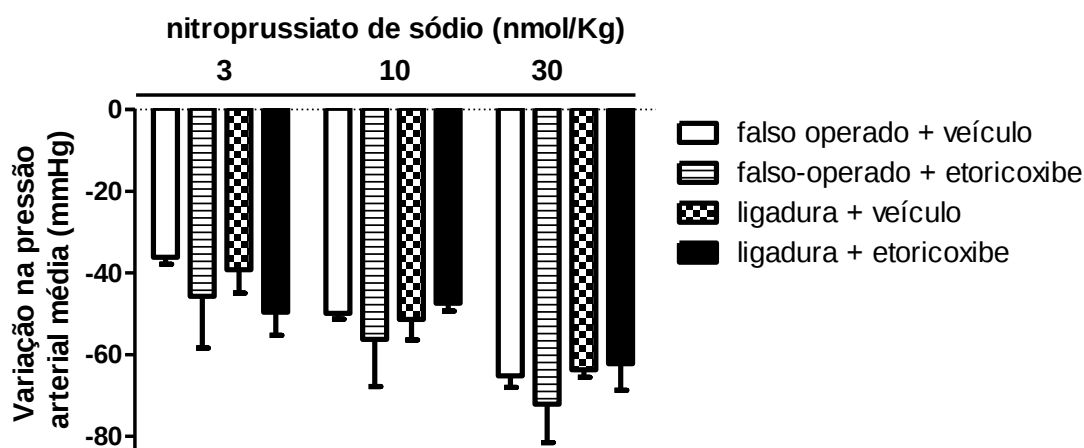


Figura 20: Efeito do etoricoxibe sobre a queda de pressão arterial média (mmHg) induzida pelo nitroprussiato de sódio em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia. Nota: Os animais foram tratados com etoricoxibe (10 mg/kg, v.o.) ou veículo (água, 100 μ L/100 g, v.o.) a partir do décimo quarto dia após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia. Após sete dias de tratamento os animais foram preparados para registro da pressão arterial. Doses crescentes de nitroprussiato de sódio foram injetadas (i.v.) e a variação na pressão arterial média foi registrada. As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 8 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. ($p > 0,05$)

Conforme se observa nas figuras 21 e 22, não houve alteração na resposta pressórica tanto para fenilefrina como para angiotensina II em nenhum dos grupos avaliados.

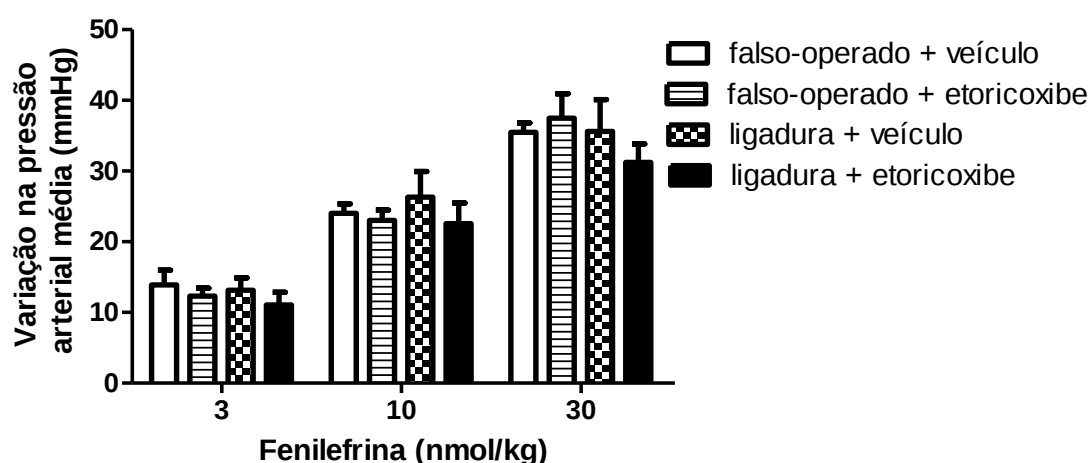


Figura 21: Efeito do etoricoxibe sobre o aumento de pressão arterial média (mmHg) induzido pela fenilefrina em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia. Nota: Os animais foram tratados com etoricoxibe (10 mg/kg, v.o.) ou veículo (água, 100 μ L/100 g, v.o.) a partir do décimo quarto dia após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia. Após sete dias de tratamento os animais foram preparados para registro da pressão arterial. Doses crescentes de fenilefrina foram injetadas (i.v.) e a variação na pressão arterial média foi registrada. As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 8 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. ($p > 0,05$)

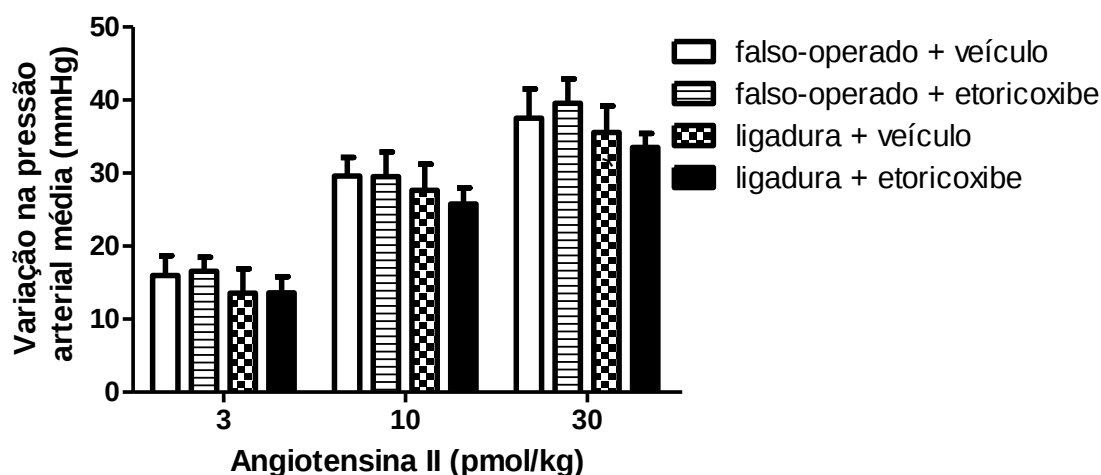


Figura 22: Efeito do etoricoxibe sobre o aumento de pressão arterial média (mmHg) induzido pela angiotensina II em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia. Nota: Os animais foram tratados com etoricoxibe (10 mg/kg, v.o.) ou veículo (água, 100 μ L/100 g, v.o.) a partir do décimo quarto dia após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia. Após sete dias de tratamento os animais foram preparados para registro da pressão arterial. Doses crescentes de angiotensina II foram injetadas (i.v.) e a variação na pressão arterial média foi registrada. As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 8 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. ($p > 0,05$)

Concordando com a ausência de alteração na resposta a agentes vasoconstritores, não foram observadas diferenças na pressão arterial média entre os grupos estudados (figura 23).

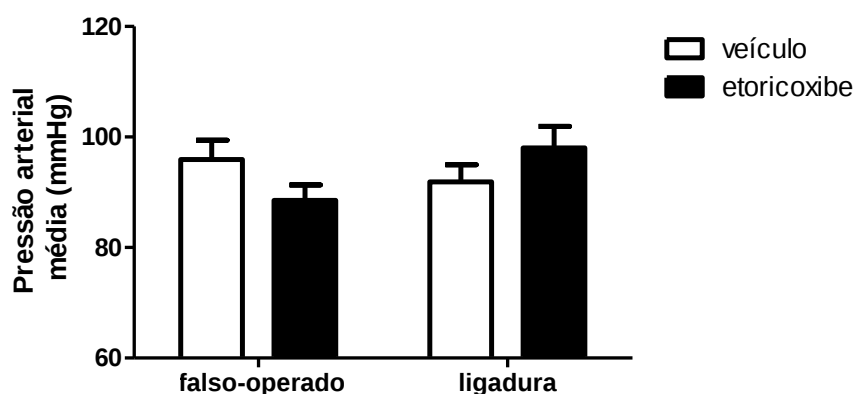


Figura 23: Efeito do etoricoxibe sobre a pressão arterial média (mmHg) em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia. Nota: Os animais foram tratados com etoricoxibe (10 mg/kg, v.o.) ou veículo (água, 100 μ L/100 g, v.o.) a partir do décimo quarto dia após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia. Após sete dias de tratamento os animais foram preparados para registro da pressão arterial média. As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 8 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. ($p > 0,05$)

Por outro lado, o etoricoxibe reduziu a frequência cardíaca basal dos animais com periodontite, entretanto, sem alterar a frequência cardíaca do grupo falso-operado (figura 24).

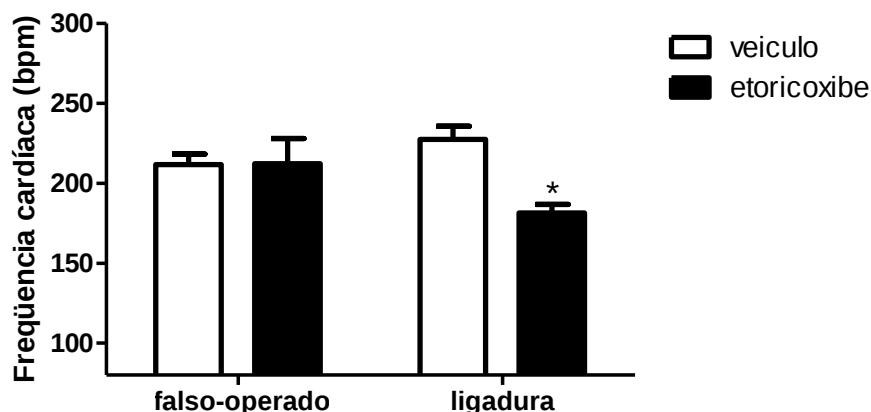


Figura 24: Efeito do etoricoxibe sobre a frequência cardíaca (bpm) em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.

Nota: Os animais foram tratados com etoricoxibe (10 mg/kg, v.o.) ou veículo (água, 100 µL/100 g, v.o.) a partir do décimo quarto dia após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia. Após sete dias de tratamento os animais foram preparados para registro da frequência cardíaca. As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 8 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (* $p < 0,05$, em relação aos demais grupos)

5.6 AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE CARDÍACA: RESPOSTA À ISOPRENALINA - EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO TARDIA DA COX-2

Diante da redução de frequência cardíaca gerada pelo etoricoxibe em animais com periodontite (figura 24), a próxima etapa foi avaliar a funcionalidade cardíaca, através do aumento de frequência cardíaca induzido pela isoprenalina.

Como pode ser observado na figura 25, não houve alteração no aumento de frequência cardíaca induzido pela isoprenalina em nenhum dos grupos avaliados.

Avaliamos também a queda de pressão arterial induzida pela isoprenalina. Como pode ser observado na figura 26, os animais com ligadura quer receberam etoricoxibe apresentaram uma menor redução da pressão arterial mediada pela isoprenalina (Figura 26).

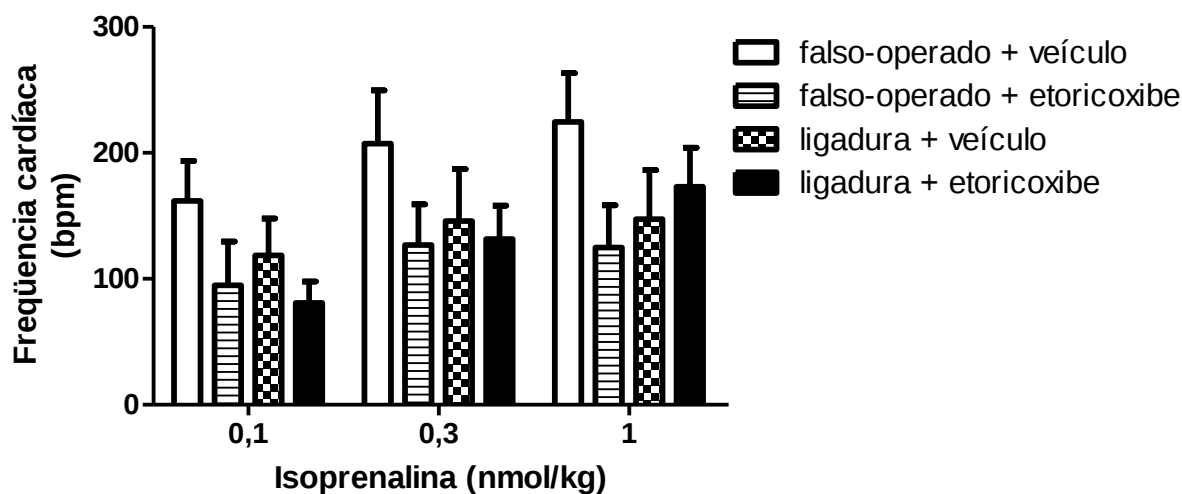


Figura 25: Efeito do etoricoxibe sobre o aumento de frequência cardíaca induzido pela isoprenalina em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.

Nota: Os animais foram tratados com etoricoxibe (10 mg/kg, v.o.) ou veículo (água, 100 μ L/100 g, v.o.) a partir do décimo quarto dia após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia. Após sete dias de tratamento os animais foram preparados para registro da pressão arterial. Doses crescentes de isoprenalina foram injetadas (i.v.) e a variação na frequência cardíaca foi registrada. As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 8 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. ($p > 0,05$)

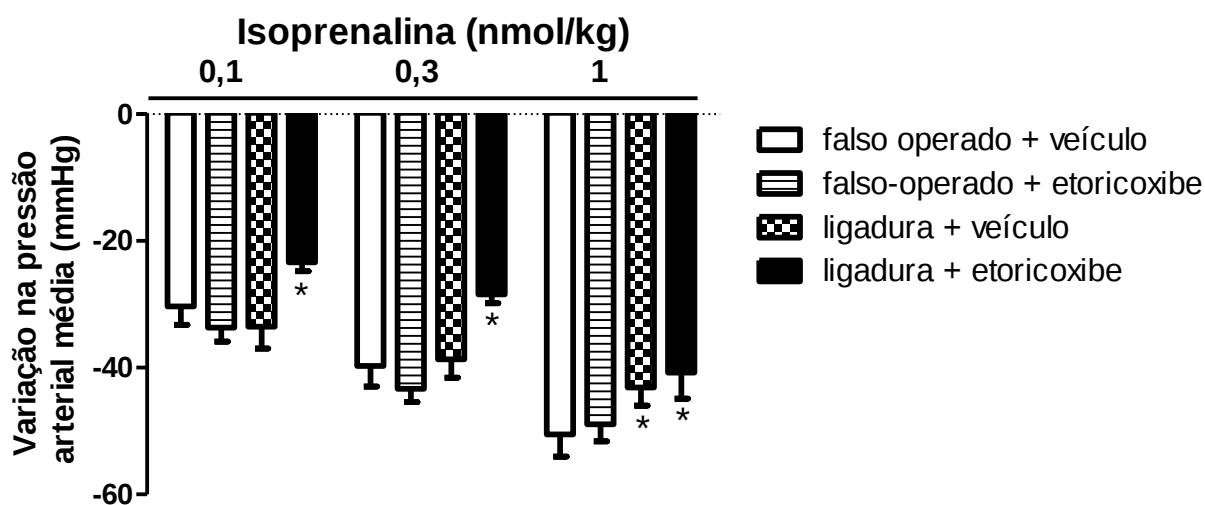


Figura 26: Efeito do etoricoxibe sobre a queda de pressão arterial induzida pela isoprenalina em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.

Nota: Os animais foram tratados com etoricoxibe (10 mg/kg, v.o.) ou veículo (água, 100 μ L/100 g, v.o.) a partir do décimo quarto dia após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia. Após sete dias de tratamento os animais foram preparados para registro da pressão arterial. Doses crescentes de isoprenalina foram injetadas (i.v.) e a variação na pressão arterial média foi registrada. As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 8 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (*) representa significância estatística, $p < 0,05$, para com os demais grupos)

5.7 HISTOLOGIA CARDÍACA DOS RATOS INFARTADOS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO TARDIA DA COX-2

A fim de se analisar histologicamente a possível relação entre a periodontite, a inibição seletiva da COX-2 e o infarto agudo do miocárdio, os ratos receberam doses subcutâneas de isoprenalina (80 mg/kg/s.c.) nos dias 19 e 20 do experimento, conforme ilustra a figura 15. No dia 21, os ratos foram sacrificados por exsanguinação e tiveram seus corações removidos para análise histológica. Foram realizados cortes longitudinais do ventrículo esquerdo.

A figura que segue (figura 27) mostra os cortes histológicos realizados.

A imagem A representa o tecido cardíaco de um animal *naïve*, ou seja, não submetido a nenhum procedimento e, portanto com ausência de infiltrado inflamatório e/ou edema intercelular.

Nas demais imagens (B, C, D e E), observa-se a presença de infiltrado inflamatório – predominantemente células mononucleares, leucócitos – bem como de edema intercelular; para onde apontam as setas.

As alterações são mais evidentes nos grupos falso-operado + etoricoxibe (C) e ligadura + etoricoxibe (E).

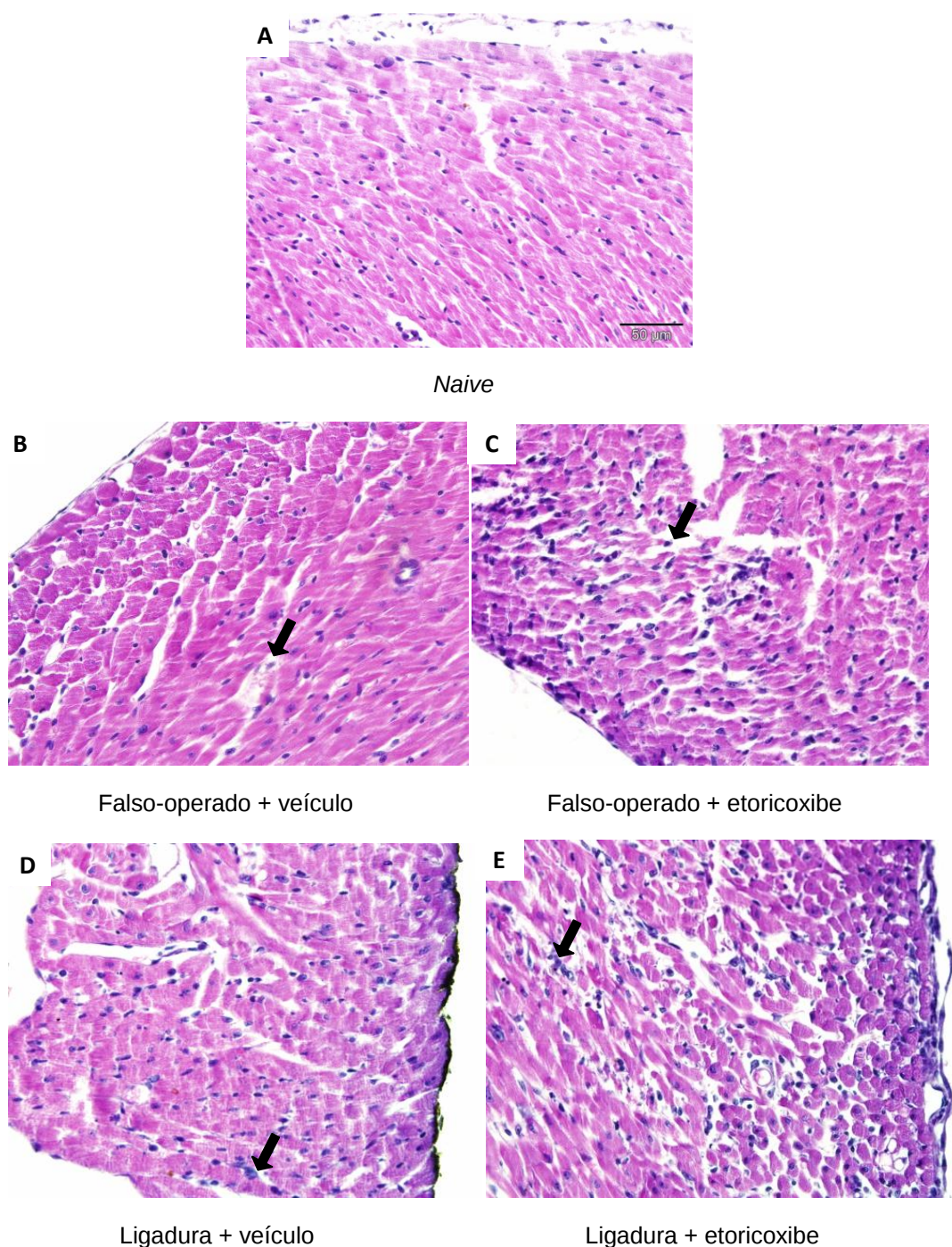


Figura 27: Efeito do etoricoxibe sobre o tecido cardíaco em resposta a doses subcutâneas de isoprenalina de animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.

Nota: Representação histológica cardíaca da região de ventrículo esquerdo dos animais infartados. Os animais foram tratados por sete dias com etoricoxibe (10 mg/kg, v.o.) ou veículo (água, 100 µL/100 g, v.o.) a partir do décimo quarto dia após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia. Nos dias seis e sete do tratamento, os animais receberam doses subcutâneas (uma vez ao dia) de isoprenalina 80 mg/kg. Após sete dias de tratamento os animais foram exsanguinados e tiveram seus corações removidos para análise histológica. As setas apontam para a maior concentração de infiltrado inflamatório (predominantemente leucócitos) mais evidente nos grupos falso-operado + etoricoxibe (C) e ligadura + etoricoxibe (E).

6 DISCUSSÃO

Existem condições de natureza biológica, comportamental ou ambiental que podem influenciar no estabelecimento e na progressão da doença periodontal, os chamados fatores de risco (Clarke & Hirsch¹¹⁰ 1995; Albandar¹¹¹ 2002). Atualmente, os fatores de risco aceitos e comprovados em estudos epidemiológicos e longitudinais são: o tabagismo, o diabetes mellitus e a associação de alguns tipos de microorganismos (Albandar¹¹¹ 2002). Doenças cardiovasculares ainda não correspondem a fator de risco clássico, porém é indiscutível sua inter-relação com a periodontite e vários estudos reportam a verossimilhança de tal associação (Demmer, Desvarieux⁸ 2006, Lamster et al.¹¹ 2008; Assinger et al.¹² 2011).

Durante processos inflamatórios, como por exemplo, a doença periodontal, há um aumento na expressão de COX-2 (Noguchi et al.¹¹² 2007). Este aumento se associa ao desenvolvimento de disfunção endotelial, que por sua vez é a precursora de aterosclerose e cardiopatias. Apesar de ser uma enzima marcadamente de caráter inflamatório, sua inibição se relaciona positivamente a desordens cardíacas. O objetivo deste estudo foi associar esses dois fatores relacionados a complicações cardiovasculares – doença periodontal e inibição seletiva da COX-2 – em um modelo experimental de periodontite em ratos.

Modelos animais têm sido importantes na compressão da fisiopatologia da periodontite. Estudos com modelos experimentais de periodontite em ratos mostraram que a inibição da COX-2 previne a perda óssea alveolar induzida pelas ligaduras (Azoubel et al.⁵¹ 2007, Holzhausen et al.¹¹³ 2002, Holzhausen et al.⁵⁰ 2005). Estes modelos podem contribuir também para compreensão da relação entre periodontite e alterações sistêmicas. Recentemente, por exemplo, Herrera et al.¹¹⁴ (2011) mostraram a influência da periodontite sobre alterações cardiorrenais (Herrera et al.¹¹⁴ 2011). Desta forma, a pesquisa a fim de se avaliar a resposta do hospedeiro utilizando-se modelos animais é criticamente importante na análise da doença bem como para o desenvolvimento de novas terapias.

Ao contrário do que ocorre em humanos, em que a doença periodontal – na maioria dos casos – leva anos para atingir proporções maiores de inflamação, em modelos animais a doença periodontal progride para uma destruição crônica dos tecidos em poucas semanas (Oz, Puleo¹¹⁵ 2011). Por um lado, isto consiste numa grande vantagem, por otimizar as pesquisas. Porém, não se devem descartar as diferenças existentes entre o modelo experimental e a doença em humanos, assim como a resistência natural do rato, sob condições normais, para com o desenvolvimento da periodontite – devendo o pesquisador estar ciente disso (Struillou et al¹¹⁶ 2010).

Dentre os animais utilizados como modelos de doença periodontal tem-se primatas não humanos, cães, porcos miniaturas, furões, cavalos, coelhos e roedores, cada um com suas vantagens e desvantagens (Oz, Puleo¹¹⁵ 2011). Primatas não humanos são os que mais se assemelhariam à condição humana, porém o custo elevado de uma pesquisa com animais deste porte dificulta o seu uso na pesquisa básica e em estudos terapêuticos. Em contrapartida os roedores, que apesar de não reproduzirem todos os aspectos da doença periodontal humana, são mais baratos e mais facilmente manuseáveis (Oz, Puleo¹¹⁵ 2011). O rato é o roedor mais utilizado no estudo da patogenia da doença periodontal; dentre as espécies mais comumente utilizadas destacam-se Wistar e Sprague-Dawley (Struillou et al¹¹⁶ 2010). O modelo de indução de doença periodontal em ratos é uma alternativa válida e promissora (Struillou et al.¹¹⁶ 2010), e consiste no método mais utilizado para compreensão do início e progressão da doença (Kimura et al.¹¹⁸ 2000). No entanto se deve ter em mente a contínua deposição óssea nas raízes dentais, que pode corresponder a possível viés (Struillou et al.¹¹⁶ 2010).

Alternativas para a indução da periodontite nos animais são a colocação de ligaduras e/ou a inoculação de periodontopatógenos (Oz, Puleo¹¹⁵ 2011). Dentre os periodontopatógenos que podem ser inoculados, tem-se *Porphyromonas gingivalis*, *Agreggatibacter actinomycetencomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga*, *Eikenella corrodens*, *Actinomyces viscosus* e *Streptococcus sobrinus* (Klausen et al.¹¹⁷ 1991). Como alternativa à inoculação de periodontopatógenos, destacam-se as ligaduras. As ligaduras são colocadas ao redor dos dentes do animal, a nível cervical e possivelmente na região subgengival; objetivam o acúmulo de biofilme na região com

conseqüente desenvolvimento de periodontite. As ligaduras podem ser de seda, elástico, nylon ou algodão. Há trabalhos, ainda, que relatam a indução de doença periodontal com ligaduras contaminadas com *Porphyromonas gingivalis* (Kimura et al.¹¹⁸ 2000).

No presente trabalho optou-se pelo modelo de indução de doença com ligaduras de algodão em ratos Wistar. Consiste num modelo válido, já consagrado na literatura (Holzhausen et al.¹¹³ 2002, Holzhausen et al.⁵⁰ 2005), e que comprovadamente induz uma inflamação que se assemelha à periodontite humana. Ligaduras de algodão são preferíveis aos demais materiais tendo em vista sua maior retentividade de biofilme quando comparado a fios de seda, nylon ou elástico, e desta maneira caracteriza melhor a doença periodontal. Porém, vale salientar que estes últimos materiais são melhores do que o algodão no quesito resistência.

A maioria dos trabalhos com modelos de indução de periodontite através de ligaduras reporta a utilização de uma (Azoubel et al.⁵¹ 2007, Holzhausen et al.¹¹³ 2002, Holzhausen et al.⁵⁰ 2005) ou duas (Souza et al.¹¹⁹ 2011) ligaduras, visto que a finalidade desses estudos foi avaliar os efeitos locais da periodontite sobre a perda óssea alveolar. Todavia, para o presente estudo optou-se pela colocação de quatro ligaduras porque o objetivo foi analisar alterações sistêmicas decorrentes da doença. Em estudos prévios de nosso laboratório, não foram observadas alterações sistêmicas com uma ligadura; portanto se optou pela colocação das mesmas em quatro molares de modo a proporcionar uma inflamação de maior magnitude.

Estudos pré-clínicos mostram que a inibição da COX-2 previne a perda óssea alveolar tanto com celecoxibe (Holzhausen et al.¹¹³ 2002) como com etoricoxibe (Holzhausen et al.⁵⁰ 2005; Azoubel et al.⁵¹ 2007). O presente estudo confirma esses dados. No protocolo experimental 1, demonstrou-se que o etoricoxibe preveniu a perda óssea alveolar induzida pela colocação das ligaduras ($p < 0,05$). O que permite concluir que o etoricoxibe administrado por via oral foi efetivamente absorvido e exerceu atividade antiinflamatória. Neste mesmo lote de experimentos, avaliou-se a resposta vascular dos animais à Fenilefrina e Angiotensina II (dados não mostrados), porém não foram observadas diferenças estatísticas dentre os grupos. No estudo de Holzhausen

et al.⁵⁰ (2005), os autores comprovam a adequada absorção do etoricoxibe através da quantificação sérica do fármaco por meio de HPLC (Cromatografia líquida de alta performance) (Holzhausen et al.⁵⁰ 2005).

Ainda, vale salientar que estudos clínicos relatam benefícios da inibição da COX-2, com o etoricoxibe, associada à terapia periodontal (Azoubel et al.¹²⁰ 2008). Neste estudo, os autores associam a terapia básica periodontal à administração de etoricoxibe, e mostram que essa associação promove uma redução nos níveis de PGE₂; o que se pode relacionar a discreto benefício à condição óssea periodontal. No entanto, parâmetros cardiovasculares do uso de inibidores seletivos da COX-2 durante processos inflamatórios, assim como a periodontite, ainda não foram avaliados.

Desde a introdução dos inibidores seletivos para ciclooxygenase-2, há uma continua discussão a respeito de sua segurança e efeitos adversos cardiovasculares (Funk, FitzGerald¹²¹ 2007). Ensaios clínicos controlados com placebo têm mostrado que coxibs podem causar complicações cardiovasculares (infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca e trombose venosa) principalmente com o uso crônico desses fármacos, afetando aproximadamente de 1% a 2% dos pacientes por ano (FitzGerald⁷² 2004). Estes dados levaram à retirada do rofecoxib e valdecoxib do mercado. Atualmente no Brasil apenas o celecoxibe e o etoricoxibe são comercializados, ambos com retenção de receita médica e com clara indicação dos riscos de complicações cardiovasculares (Resolução - RDC nº 79⁸³).

A fim de se estudar a inibição seletiva da COX-2, podem-se fazer uso de compostos químicos de uso exclusivo laboratorial, como SC 236: 4-[5-(4-chlorophenyl)-1-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]-benzenesulfonamide (Balzary, Cocks¹²² 2006, Queiroz-Junior et al.¹²³ 2009), que apresenta alta especificidade e seletividade para a COX-2. Todavia, como se buscou aproximar o presente trabalho, na medida do possível, da prática clínica, optou-se por um inibidor que estivesse disponível para uso clínico. Nesta categoria, como mencionado anteriormente, enquadram-se apenas o celecoxib e o etoricoxibe (Resolução - RDC nº 79⁸³). Optou-se por este último devido à sua seletividade para a COX-2 ultrapassar em mais de 10 vezes a seletividade do

celecoxibe (Martina et al.¹²⁴ 2005). Ainda, uma vez que os efeitos deletérios dos coxibs são mais associados ao uso crônico desses medicamentos (Trelle et al.¹²⁵ 2011), o etoricoxibe foi administrado por sete dias – administração crônica considerando-se o metabolismo de roedores.

A partir de sete dias da colocação das ligaduras já se observa significativa perda óssea, porém esta se torna mais marcante a partir do décimo quarto dia. Além disso, alguns estudos (Queiroz-Junior et al.¹²³ 2009) e assim como dados preliminares do nosso laboratório (Fernandes et al.¹²⁶ 2011), mostram que alterações sistêmicas decorrentes da periodontite animal têm um pico de ocorrência em torno da segunda semana de indução da doença. Portanto, como o objetivo deste estudo foi avaliar alterações sistêmicas decorrentes da interação destes dois fatores (periodontite e inibição da COX-2), o etoricoxibe começou a ser administrado apenas no dia 14 após a colocação das ligaduras. Todas as análises foram realizadas no vigésimo primeiro dia de experimento.

Corroborando com os trabalhos que mostram efeitos crônicos da periodontite experimental a partir do décimo quarto dia, a coleta de sangue realizada no último dia experimental (dia 21) – a fim de se quantificar óxido nítrico nestes animais – mostra que o grupo periodontite que recebeu veículo apresentou concentração dos metabólitos do óxido nítrico (NOx) estatisticamente menor do que o grupo falso-operado que recebeu veículo ($p < 0,05$). O NO se associa a eventos inflamatórios, bem como à perda óssea decorrente da periodontite (Leitão et al.¹²⁷ 2005). Um aumento de NO geralmente caracteriza um processo inflamatório crônico, visto que durante a inflamação há aumento na expressão de iNOS, que produz maiores quantidades de NO. Por outro lado, a redução de NO caracteriza uma disfunção endotelial que por sua vez, pode ser desencadeada pela resposta inflamatória. Tal resposta inflamatória pode não ter magnitude suficiente a ponto de induzir a expressão de iNOS, porém pode ser suficiente para gerar disfunção endotelial e, deste modo, reduzir a produção de NO pela eNOS. Portanto, uma redução dos níveis de óxido nítrico pode ser consequência de um processo inflamatório crônico e insidioso (Verma et al.⁴⁴ 2003).

Interessantemente, os grupos que receberam etoricoxibe (ligadura ou falso-operado) apresentaram considerável aumento dos níveis de NOx ($p < 0,05$). Há trabalhos que mostram aumento de NOx associado ao uso de etoricoxibe (Behal et al.¹⁰⁵ 2009) e nimesulida, o que pode diminuir o estresse oxidativo, reduzindo desta forma a reação do NO com espécies reativas de oxigênio e aumentando a biodisponibilidade do NO (Lv et al.¹⁰⁶ 2007). No entanto, devem-se considerar as limitações da metodologia empregada. Assim como nos estudos de Behal et al.¹⁰⁵ (2009), Lv et al.¹⁰⁶ (2007), o presente trabalho adotou a quantificação de NO através do método de Griess, metodologia indireta, uma vez que quantifica a concentração de metabólitos de NO – nitrito e nitrato, o que pode consistir num possível viés. Como complementação a esta metodologia, seria interessante avaliar o nível de expressão das proteínas eNOS e iNOS nos vasos dos animais dos grupos experimentais.

Através da coleta sanguínea, além da quantificação de NOx também foi realizado hemograma dos animais. Porém, não foram observadas alterações significativas com relação a nenhum componente sanguíneo (leucócitos, plaquetas, eritrócitos, hemoglobina e granulócitos) ($p > 0,05$). Com relação à perda óssea alveolar média induzida pelas ligaduras, neste lote experimental não houve alterações dentre os grupos ligadura que receberam veículo ou etoricoxibe ($P > 0,05$), havendo diferença apenas entre ligadura (que recebeu veículo ou etoricoxibe) e falso-operado (que recebeu veículo ou etoricoxibe); os grupos ligadura apresentaram significativa perda óssea alveolar média ($p < 0,05$) ao passo que os grupos falso-operados demonstraram normalidade na altura da crista óssea alveolar, o que caracteriza um estado de saúde periodontal. Esse resultado foi perfeitamente esperado, uma vez que a partir do décimo quarto dia, período em que se iniciou a administração de etoricoxibe, o processo inflamatório já estava instalado.

Em estudo *in vitro*, verificou-se que a inibição da COX-2 através do etoricoxibe na presença de inflamação, aumentou significativamente a resposta vasoconstritora à noradrenalina (Foudi et al.⁴⁵ 2009). O objetivo inicial do presente trabalho foi verificar se a administração do etoricoxibe, num modelo de periodontite em animais, teria efeito semelhante. Ao contrário do

esperado, ao vigésimo primeiro dia a resposta vasoconstritora desses animais – tanto para fenilefrina como para angiotensina II – não apresentou diferenças com significância estatística dentre os grupos ($p>0,05$). Também não foi observada alteração na pressão arterial média ($p>0,05$). Tais dados diferem do inicialmente esperado bem como dos dados obtidos no estudo de Foudi et al.⁴⁵ (2009). Uma das explicações seria a dificuldade em se extrapolar os dados de um estudo *in vitro*. No referido estudo, levou-se em consideração unicamente a resposta local do vaso, extinguindo-se as variáveis sistêmicas que interferem na vasoconstrição do animal. Além disso, deve-se considerar a possibilidade de a periodontite não gerar alteração sistêmica suficiente para promover tal alteração. Neste aspecto, é importante lembrar que no trabalho Foudi et al.⁴⁵ (2009) o tecido foi incubado diretamente com IL-1 β e LPS, que conseqüentemente induzem a expressão de COX-2 e assim, simula um processo inflamatório. Desta maneira, os resultados obtidos refletem o efeito direto desses dois componentes, bem como da COX-2, sobre o tecido, excluindo-se demais variáveis.

Em contrapartida, o grupo ligadura que recebeu etoricoxibe mostrou redução na frequência cardíaca ($p<0,05$) quando comparado com os demais, dado que sugere que apesar de não se terem observado alterações na resposta vasoconstritora, como se esperava com a idéia inicial do trabalho, foram observadas alterações na função cardíaca. Dessa maneira, o trabalho seguiu para uma segunda etapa, que foi estudar com mais detalhes a funcionalidade cardíaca dos animais de cada grupo experimental.

Para tanto, avaliou-se a resposta dos grupos experimentais à isoprenalina, que é uma droga que promove um aumento na frequência cardíaca seguido por uma queda na pressão arterial. Desse modo, sobrecarrega o músculo cardíaco e consiste num modelo válido para se avaliar a função do coração. A isoprenalina, assim como os demais agentes vasoativos, foi administrada em 3 doses crescentes. Não houve alterações estatisticamente significantes quanto às variações na frequência cardíaca dentre os grupos. Porém, com relação à queda na pressão arterial média, mais uma vez o grupo ligadura que recebeu etoricoxibe apresentou alteração ($p<0,05$), caracterizada por uma menor queda na pressão arterial, o que sugere

que parte da vasodilatação induzida pela isoprenalina seja mediada pela COX-2 durante processos inflamatórios.

A isoprenalina é agonista β -adrenérgico não seletivo, e desta maneira promove vasodilatação (Pourageaund et al.¹²⁸ 2005). Dentre os receptores β , distinguem-se 3: β_1 , β_2 e β_3 . São mediadores da resposta cardiovascular à noradrenalina liberada de terminais nervosos simpatomiméticos e à adrenalina circulante. São estimulados ou inibidos por vários compostos usados no tratamento de importantes doenças como hipertensão, arritmias cardíacas e doença cardíaca isquêmica. Todos os receptores β atuam por estímulo da proteína G, levando à ativação da adenilil ciclase e acúmulo do segundo mensageiro AMP cíclico. Está perfeitamente estabelecida a existência de receptores β adrenérgicos na célula endotelial, o que contribui para a regulação do tônus vasomotor (Guimarães, Moura¹²⁹ 2001) e alguns estudos sugerem que o endotélio tenha papel facilitador no relaxamento induzido por agonistas β -adrenérgicos (Graves, Poston¹³⁰ 1993). O componente de relaxamento da isoprenalina parece envolver duas vias: uma dependente do endotélio e outra independente do endotélio. O componente dependente do endotélio é devido à ativação dos receptores β -adrenérgicos. Adrenoceptores vasculares são afetados por inúmeras doenças, às vezes como consequência de alteração dos vasos, ou então por eles participarem na gênese da doença, sendo sua causa primária (Guimarães, Moura¹²⁹ 2001).

Diante da evidência de disfunção endotelial gerada pelo resultado dos experimentos com a isoprenalina, avaliou-se de forma mais adequada a função endotelial através da resposta vasodilatadora à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio. Escolheram-se dois diferentes vasodilatadores devido aos distintos mecanismos de ação de ambos. A acetilcolina exerce sua função por meio de receptor acoplado à membrana da célula endotelial. Desta maneira, estimula a própria célula endotelial a produzir NO, que atua sobre a célula do músculo liso e promove vasodilatação. O nitroprussiato de sódio, por sua vez, promove vasodilatação independentemente do endotélio, uma vez que não necessita de receptores e assim, age como um doador de NO.

Apesar de não haver diferenças com significância estatística quanto à resposta aos agentes vasodilatadores, pode-se sugerir que a inibição da COX-2 durante a periodontite prejudique de alguma maneira o bom funcionamento do endotélio, denotando uma disfunção endotelial no dia 21 do protocolo experimental. Essa disfunção pode ser caracterizada pela tendência de o grupo ligadura que recebeu etoricoxibe em apresentar menor vasodilatação em resposta à acetilcolina ($p>0,05$) – que estimula a produção de NO pela célula endotelial. Dado que converge com as alterações observadas em resposta à isoprenalina.

Embora os experimentos anteriores não tenham mostrado diferenças entre os grupos com relação ao aumento na frequência cardíaca induzido pela isoprenalina, não se pôde descartar a participação da COX-2 em alterações cardíacas durante a periodontite. Portanto, a próxima etapa do trabalho foi avaliar possíveis alterações cardíacas a nível histológico, uma vez que se detectou que a função cardíaca parecia estar alterada e, desta maneira, haver dano tecidual. Assim, utilizou-se um modelo de indução de infarto com elevadas doses subcutâneas de isoprenalina para posterior análise do tecido cardíaco, assim como reportado por demais trabalhos com modelos experimentais de infarto (Ribeiro et al.¹³¹ 2009, Patel et al.¹³² 2010, Rona et al.¹⁰⁹ 1959).

Com o intuito de induzir infarto do miocárdio em animais, podem-se usar dois modelos: cirúrgico ou farmacológico. O primeiro consiste na colocação de ligaduras na artéria coronária. É pouco custoso e bem estabelecido para esta finalidade (Hou et al.¹³³ 2011), porém possui o inconveniente de requerer um acesso cirúrgico para sua execução. Alternativa a este modelo cirúrgico é a administração subcutânea de altas doses de isoprenalina (Rona et al, 1959¹⁰⁹, Tanwar et al.¹³⁴ 2010). Este método farmacológico com a isoprenalina tem a vantagem de ser menos invasivo por dispensar a cirurgia para colocação das ligaduras na artéria coronária. Pode ser empregado através da colocação subcutânea de dispositivo de liberação lenta de isoprenalina (Heather et al.¹³⁵ 2009) ou por injeções subcutâneas da droga (Rona et al, 1959¹⁰⁹, Tanwar et al.¹³⁴ 2010).

A isoprenalina é agonista β_1 e β_2 adrenérgico e tem cronotropismo agudo positivo e inotropismo (Kitagawa et al.¹³⁶ 2004). Esta droga promove uma significativa queda na pressão arterial coincidente com um sustentado aumento na frequência cardíaca. Com essa diferença entre demanda e oferta de oxigênio no músculo cardíaco, essas doses de isoprenalina são capazes de promover uma lesão com características semelhantes ao infarto miocárdico sem, no entanto, promover lesões necróticas em outros órgãos. O infarto obtido, desta maneira, ocorre por necrose do músculo cardíaco. No presente trabalho a opção foi pelo modelo farmacológico por este dispensar a cirurgia necessária para a colocação de ligaduras na artéria coronária, como previamente descrito por Hou et al.¹³³ (2011).

Foram observadas alterações histológicas nos quatro grupos experimentais, caracterizadas por edema intercelular e infiltrado inflamatório rico em células mononucleares. Porém, o infiltrado inflamatório foi mais pronunciado nos grupos que receberam etoricoxibe, tanto em animais do grupo ligadura como do grupo falso-operado. Tal fato sugere que a inibição crônica da COX-2 possa exacerbar alterações cardíacas induzidas pela isoprenalina em modelos animais.

Embora o mecanismo que relaciona doença periodontal e risco cardiovascular não esteja totalmente estabelecido (Demmer, Desvarieux⁸ 2006), vários trabalhos têm suportado a idéia de que a inflamação sistêmica nos pacientes com periodontite seja o elo entre estas patologias (Lalla et al.¹⁵ 2003, Lamster et al.¹¹ 2008, Ekuni et al.²⁸ 2009). A inflamação sistêmica gera alterações vasculares, principalmente nas células endoteliais. Suportando esta idéia, foi demonstrado que a dilatação dependente de endotélio da artéria braquial está diminuída em pacientes com doença periodontal severa (Amar et al.³³ 2003, Mercanoglu et al.³⁴ 2004). A redução na reatividade vascular dependente de endotélio caracteriza o quadro de disfunção endotelial, atualmente considerado a primeira etapa para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como hipertensão e aterosclerose (Sitia et al.¹³⁷ 2010). Como descrito acima, a enzima COX-2 tem a sua expressão aumentada durante o

processo inflamatório podendo desta forma, participar da inflamação da célula endotelial.

O presente trabalho sugere que a inibição seletiva da COX-2 durante um processo inflamatório crônico, assim como a doença periodontal, pode comprometer a funcionalidade do endotélio e exacerbar alterações cardiovasculares.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ❖ O etoricoxibe previne a perda óssea alveolar induzida por ligaduras em modelo experimental de periodontite em ratos;
- ❖ A quantificação de NOx é reduzida no grupo periodontite que recebeu veículo quando comparada com seu respectivo falso-operado; e igualmente aumentada nos grupos que receberam etoricoxibe (ligadura ou falso-operado);
- ❖ A administração de etoricoxibe em animais com periodontite não altera a vasoconstrição decorrente da administração de fenilefrina ou angiotensina II;
- ❖ A administração de etoricoxibe em animais com periodontite não altera a pressão arterial média dos animais, porém promove uma queda na frequência cardíaca, o que sugere o envolvimento da COX-2 na função cardíaca de animais com periodontite;
- ❖ Apesar da redução na frequência cardíaca basal dos animais com periodontite e tratados com etoricoxibe, o aumento da frequência cardíaca induzido pela isoprenalina foi semelhante em todos os grupos experimentais;
- ❖ A queda na pressão arterial em resposta à isoprenalina é alterada no grupo ligadura que recebeu etoricoxibe; caracterizada por uma menor queda na pressão arterial, quando comparado com os demais. Este dado sugere envolvimento da COX-2 na vasodilatação induzida pela isoprenalina durante processos inflamatórios;
- ❖ A vasodilatação induzida pelo nitroprussiato de sódio não mostrou alteração dentre os grupos experimentais. Porém há uma tendência do grupo ligadura que recebeu etoricoxibe em apresentar menor vasodilatação em resposta à acetilcolina;
- ❖ Quando submetidos à isquemia induzida por altas doses de isoprenalina, todos os grupos apresentaram alterações histológicas caracterizadas por edema intercelular e infiltrado inflamatório rico em células mononucleares, porém estas são mais evidentes nos grupos que receberam etoricoxibe.

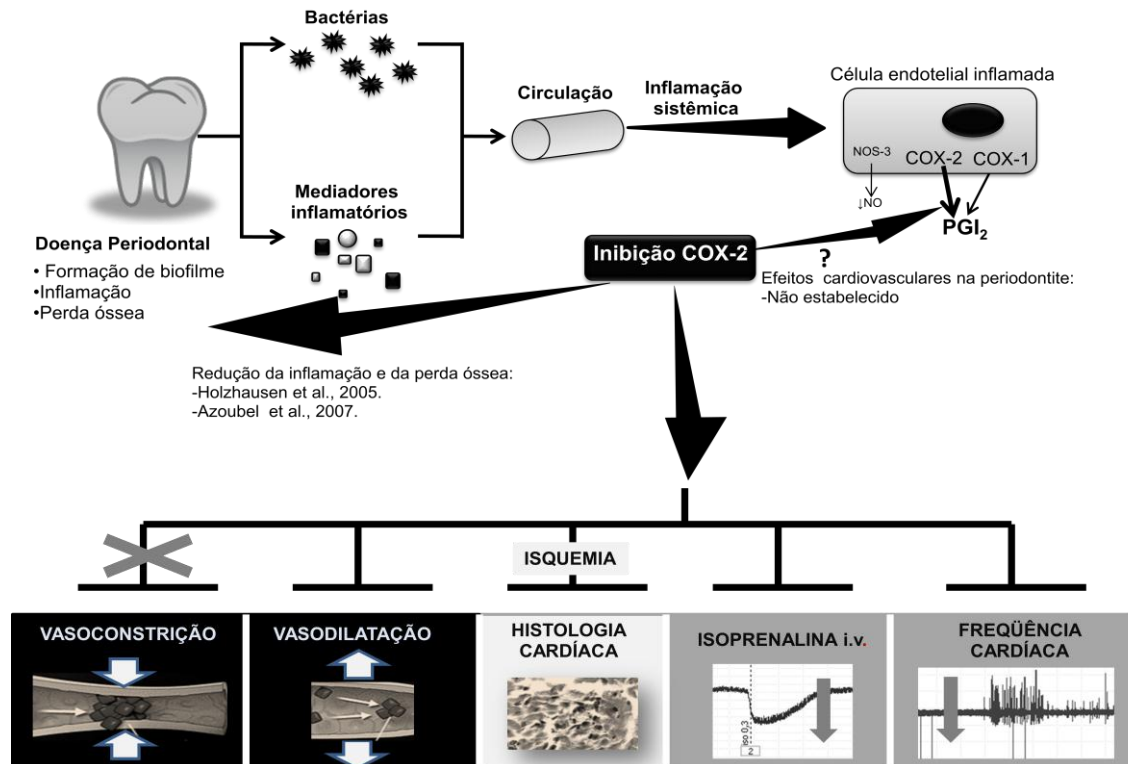


Figura 28: Representação esquemática das considerações finais do trabalho – Efeitos da inflamação sistêmica decorrente da periodontite sobre o sistema cardiovascular.

Nota: A inflamação sistêmica decorrente da doença periodontal tem efeitos deletérios diretos sobre a célula endotelial bem como sobre o sistema cardiovascular. A inibição da COX-2 durante a periodontite não acarreta em prejuízos na resposta vasoconstritora, porém é observada discreta redução na vasodilatação bem como redução na frequência cardíaca. Histologicamente, há maiores alterações frente a uma isquemia.

REFERÊNCIAS

1. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8):1569-76.
2. Hamp SE, Nyman S., Lindhe J. Periodontal treatment of multirooted teeth. Results after 5 years. *J Clin Periodontol*. 1975 Aug;2(3):126-35.
3. DeSanctis M, Murphy KG. The role of resective periodontal surgery in the treatment of furcation defects. *Periodontol 2000*. 2000 Feb;22:154-68.
4. Renvert S, Persson GR. A systematic review on the use of residual probing depth, bleeding on probing and furcation status following initial periodontal therapy to predict further attachment and tooth loss. *J Clin Periodontol*. 2002;29(3):82-9.
5. Brown LJ, Brunelle JA, Kingman A. Periodontal status in the United States, 1988-1991: Prevalence, extent and demographic variation. *J Dent Res*. 1996 Feb;75:672-83.
6. Billings FA. Chronic focal infections and their etiologic relations to arthritis and nephritis. *Arch Intern Med*. 1912;9:484-98.
7. Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen VV, Rasi VP, Ksaniemi YA, Syrjälä SL, et al. Association between dental health and acute myocardial infarction. *Br Med J*. 1989 Feb;298:779-782.
8. Demmer RT, Desvarieux M. Periodontal infections and cardiovascular disease – the heart of matter. *J Am Dent Assoc*. 2006 Mar;137 (10):14-20.
9. Grosser T, Yusuff S, Cheskis E, Pack MA, FitzGerald GA. Developmental expression of functional cyclooxygenases in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Jun;99:8418–23.
10. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997 Jun;14:9-11.
11. Lamster IB, DePaola DP, Oppermann RV, Papapanou PN, Wilder RS. The relationship of periodontal disease to diseases and disorders at distant sites: communication to health care professionals and patients. *J Am Dent Assoc*. 2008 Dec;139:1389-97.
12. Assinger A, Buchberger E, Laky M, Esfandeyari A, Brostjan C, Volf I. Periodontopathogens induce soluble P-selectin release by endothelial cells and platelets. *Thromb Res*. 2011 Nov;127(1):20-6.

13. Genco R, Offenbacher S, Beck J. Periodontal disease and cardiovascular disease. Epidemiology and possible mechanisms. J Am Dent Assoc. 2002 Jun;133:14-22.
14. Beck JD, Elter JR, Heiss G, Couper D, Mauiello SM, Offenbacher S. Relationship of periodontal disease to carotid artery intima-media wall thickness: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. Arterioscler Throb Vasc Biol. 2001 Nov;21:1816-22.
15. Lalla E, Lamster IB, Hofmann MA, Bucciarelli L, Jerud AP, Tucker S, et al. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-Null Mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 Aug;23:1405-11.
16. Maekawa T, Takahashi N, Tabeta K, Aoki Y, Miyashita H, Miyauchi S, et al. Chronic oral Infection with *Porphyromona gingivalis* accelerates atheroma formation by shifting the lipid profile. Plos One. 2011; 6(5):e20240. Epub 2011 May 19.
17. Behle JH, Papapanou PN. Periodontal infections and atherosclerotic vascular disease: an update. Int Dent J. 2006 Aug; 56: 256-62.
18. Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwanoto N, Fujii H, et al. Disruption of tumor necrosis factor- α gene diminishes the development of atherosclerosis in Apo-E-deficient mice. Atheroscler. 2005 May;180:11-7.
19. Carranza A, Litterio MC, Prince PD, Mayer MA, Ingaramo PI, Ronco MT, et al. Lipopolysaccharide (LPS) induction of nitric oxide synthase-2 and cyclooxygenase-2 is impaired in fructose overloaded rats. Life Sci. 2010 Feb;88(7-8):307-13.
20. Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. Lab Invest. 2006 Jan;86:9-22.
21. Tsioufis C, Kasiakogias A, Thomopoulos C, Stefabadis C. Periodontitis and blood pressure: The concept of dental hypertension. Atheroscler. 2011 Nov;219(1):1-9. Epub 2011 May 6.
22. Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs Jr DR, Sacco RL, et al. Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness: the oral infections and vascular epidemiology study (INVEST). Circulation. 2005 Feb;111(5):576-82.
23. Hujoel PP, Drangsholt M, Spiekerman C, DeRouen TA. Periodontal disease and coronary heart disease risk. JAMA. 2000 Sep;284:1406-10.
24. Engström S, Gahnberg L, Högeberg H, Svärdsudd K. Association between High Blood Pressure and Deep Periodontal Pockets. Upsala J Med Sci. 2007;112(1):95-103.

25. Gotsman I, Lotan C, Soskolne A, Rassevsky, Pugatsch T, Lapidus L, et al. Periodontal destruction is associated with coronary artery disease and periodontal infection with acute coronary syndrome. *J Periodontol*. 2007 May;78:849-58.
26. Engebretson SP, Lamster IB, Elkind MSV, Rundek T, Serman NJ, Demmer RT, et al. Radiographic measures of chronic periodontitis and carotid artery plaque. *Stroke*. 2005 Mar;36(3):561-6.
27. Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, et al. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med*. 2007 Mar;356(9):911-20.
28. Ekuni D, Tomofuji T, Sanbe T, Irie K, Azuma T, Maruyama T, et al. Periodontitis-induced lipid peroxidation in rat descending aorta is involved in the initiation of atherosclerosis. *Periodontal Res*. 2009 Aug;44(4):434-42.
29. Higashi Y, Goto C, Jitsuiki D, Umemura T, Nishioka K, Hidaka T, et al. Periodontal Infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients. *Hypertension*. 2008 Feb;51:446-53.
30. Higashi Y, Goto C, Hidaka T, Soga J, Nakamura S, Fujii Y, et al. Oral infection-inflammatory pathway, periodontitis, is a risk factor for endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2009 Oct;206(2):604-10.
31. Paquette DW, Brodala N, Nichols TC. Cardiovascular disease, inflammation, and periodontal infection. *Periodontol 2000*. 2007;44:113-26.
32. Dahlof, B. Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *Am J Cardiol*. 2010 Jan;105:3–9.
33. Amar S, Gokce N, Morgan S, Loukideli M, Van Dyke TE, Vita JA. Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Jul;23(7):1245-9.
34. Mercanoglu F, Oflaz H, Öz O, Gökbüget AY, Genchellac H, Sezer M, et al. Endothelial Dysfunction in patients with chronic periodontitis and its improvement after initial periodontal therapy. *J Periodontol*. 2004 Dec;75(12):1694-700.
35. Seinost G, Wimmer G, Skerget M, Thaller E, Brodmann M, Gasset R, et al. Periodontal treatment improves endothelial dysfunction in patients with severe periodontitis. *Am Heart J*. 2005 Jun;149(6):1050-4.

36. Blum A, Kryuger K, Eizenberg MM, Tatour S, Vigder F, Laster Z, et al. Periodontal care may improve endothelial function. *Eur J Intern Med*. 2007 Jul;18:295-8.
37. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*. 2007 Feb; 100(2):158-73.
38. Quyyumi AA. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med*. 1998 Jul;105(1):32-9.
39. Tan KCB, Chow WS, Ai VHG, Lam KSL. Effects of angiotensin II receptor antagonist on endothelial vasomotor function and urinary albumin excretion in type 2 diabetic patients with microalbuminuria, *Diabetes Metab Res Rev*. 2002 Jan-Feb;18(1):71-6.
40. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care*. 2009 Nov;32(2):314-21.
41. Kawashima S. The two faces of endothelial nitric oxide synthase in the pathophysiology of atherosclerosis. *Endothelium* 2004 Mar-Apr;11(2):99-107.
42. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 Aug;93(17):9114-9.
43. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov;288:373-6.
44. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. *Circulation*. 2003 Oct;108:2054-9.
45. Foudi N, Louedec, Cachina T, Brink C, Norel X. Selective cyclooxygenase-2 inhibition directly increases human vascular reactivity to norepinephrine during acute inflammation. *Cardiovasc Res*. 2009 Feb;81:269-77.
46. Bulut D, Liaghat S, Hanefeld C, Koll R, Miebach T, Mügge A. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition with parecoxib acutely impairs endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 2003 Sep;21(9):1663-7.
47. Nacci C, Tarquinio M, De Benedictis L, Mauro A, Zigrino A, Carratù MR, et al. Endothelial dysfunction in mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes is opposed by compensatory overexpression of

- cyclooxygenase-2 in the vasculature. *Endocrinology*. 2009 Feb;150(2):849-61.
48. Pilatti GL, André dos Santos F, Bianchi A, Cavassim R, Tozetto CW. The use of celecoxib and dexamethasone for the prevention and control of postoperative pain after periodontal surgery. *J Periodontol*. 2006 Nov;77(11):1809-14.
 49. Steffens JP, Santos FA, Sartori R, Pilatti GL. Preemptive dexamethasone and etoricoxib for pain and discomfort prevention after periodontal surgery: a double-masked, crossover, controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2010 Aug;81(8):1153-60.
 50. Holzhausen M, Spolidorio DM, Muscará MN, Hebling J, Spolidorio LC. Protective effects of etoricoxib, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol Res*. 2005 Jun;40(3):208-11.
 51. Azoubel MC, Menezes AM, Bezerra D, Oriá RB, Ribeiro RA, Brito GA. Comparison of etoricoxib and indomethacin for the treatment of experimental periodontitis in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2007 Jan;40(1):117-25.
 52. Das UN. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol J*. 2006 Apr;1(4):420-39.
 53. Shimizu T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009;49:123-50.
 54. Grosser T, Yu Y, FitzGerald GA. Emotion recollected in tranquility: lessons learned from the COX-2 Saga. *Annu Rev Med*. 2010;61:17-33.
 55. Williams TJ, Peck MJ. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature*. 1977 Dec;270(5637):530-2.
 56. Ferreira SH. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol*. 1972 Dec;240(102):200-3.
 57. Narumiya S, FitzGerald GA. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest*. 2001 Jul;108:25–30.
 58. Flower RJ, Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetaminophenol). *Nature* 1972 Dec;240(5381):410-1.
 59. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2002 Oct;99(21):13926-31.

60. Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest*. 2006 Jan;116(1):4-15.
61. Graham DY, White RH, Moreland LW, Chubert TT, Katz R Jaszewski R, et al. Duodenal and Gastric Ulcer Prevention with Misoprostol in Arthritis Patients Taking NSAIDs. *Ann Intern Med*. 1993 Aug;119(4):257-62.
62. Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowska I, Pawlik T. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *J Physiol Pharmacol*. 2005 Sep;56(5):33-55.
63. Seibert K, Masferrer J, Zhang Y, Gregory S, Olson G, Hauser S, et al. Mediation of inflammation by cyclooxygenase-2. *Agents Actions Suppl*. 1995;46:41–50.
64. FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med*. 2001 Aug;345(6):433-42.
65. Hawkey CJ. COX-2 chronology. *Gut*. 2005 Nov;54(11):1509-14.
66. Mitchell JA, Warner TD. COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Jan;5(1):75-86.
67. Patrono C, Baigert C. Low-dose aspirin, coxibs, and other NSAIDs: a clinical mosaic emerges. *Mol Interv*. 2009 Feb;9(1):31-9.
68. Amer M, Bead VR, Bathon J, Blumenthal RS, Edwards DN. Use of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Patients With Cardiovascular Disease. A Cautionary Tale. *Cardiol Rev*. 2010 Jul-Aug;18(4):204-12.
69. Huber MA, Terezhalmay GT. The use of COX-2 inhibitors for acute dental pain: A second look. *J Am Dent Assoc*. 2006 Apr;137:480-7.
70. Shi S, Klotz U. Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008 Mar;64:233-5.
71. Chan CC, Reid CM, Aw TJ, Liew D, Haas SJ, Krum H. Do COX-2 inhibitors raise blood pressure more than nonselective NSAIDs and placebo? An update meta-analysis. *J Hypertens*. 2009 Dec;27:2332-41.
72. FitzGerald GA. Coxibs and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2004 Oct;351:1709–11.
73. Horton, R. Vioxx, the implosion of Merck, and aftershocks at the FDA. *Lancet*. 2004 Dec;364:1995-6.

74. Vaithianathan R, Hockey PM, Moore TJ, Bates DW. Iatrogenic effects of COX-2 inhibitors in the US population: findings from the Medical Expenditure Panel Survey. *Drug Saf.* 2009;32:335–3.
75. Topol EJ. Failing the public health — rofecoxib, Merck, and the FDA. *N Engl J Med.* 2004 Oct;351:1707–9.
76. Simon LS, Weaver AL, Graham DY, Kivitz AJ, Lipsky PE, Hubbard RC, et al. Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 1999 Nov;282:1921–8.
77. Lanza FL, Rack MF, Simon TJ, Quan H, Bolognese JA, Hoover ME, et al. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 with MK-0966 is associated with less gastroduodenal damage than either aspirin or ibuprofen. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999 Jun;13:761–7.
78. Langman MJ, Jensen DM, Watson DJ, Harper SE, Zhao PL, Quan H, et al. Adverse upper gastrointestinal effects of rofecoxib compared with NSAIDs. *JAMA.* 1999 Nov;282:1929–33.
79. Sikes DH, Agrawal NM, Zhao WW, Kent JD, Recker DP, Verburg KM. Incidence of gastroduodenal ulcers associated with valdecoxib compared with that of ibuprofen and diclofenac in patients with osteoarthritis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002 Oct;14:1101–11.
80. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 Jan;96:272–7.
81. Catella-Lawson F, McAdam B, Morrison BW, Kapoor S, Kujubu D, Antes L, et al. Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 May;289:735–41.
82. Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis R, et al. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med.* 2000 Nov;343:1520–8.
83. Resolução - RDC nº 79, de 4 de novembro de 2008. Diário Oficial da União de 05/11/08. **Nº 215 seção 1.**
84. Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, et al. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science.* 2002 Apr;296(5567):539–41.
85. Smyth EM, FitzGerald GA. Human prostacyclin receptor. *Vitam Horm.* 2002;65:149–65.

86. Nyman I, Larsson H, Wallentin L. Prevention of serious cardiac events by low-dose aspirin in patients with silent myocardial ischaemia. *Lancet*. 1992 Aug;340(8818):497-501.
87. Bishop-Bailey D, Mitchell JA, Warner TD. COX-2 in cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:956-8.
88. Fries S, Grosser T, Price TS, Lawson JA, Kapoor S, DeMarco S, et al. Marked interindividual variability in the response to selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *Gastroenterology*. 2006 Jan;130(1):55-64.
89. Schwartz Z, Denison TA, Bannister SR, Cochran DL, Liu YH, Lohmann CH, et al. Osteoblast response to fluid induced shear depends on substrate microarchitecture and varies with time. *J Biomed Mater Res*. 2007 Oct;83(1):20-32.
90. Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1996 Sep;93(19):10417–22.
91. Inoue H, Taba Y, Miwa Y, Yokota C, Miyagi M, Sasaguri T. Transcriptional and posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2 expression by fluid shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Sep;22(9):1415–20.
92. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Dec;90:11693–7.
93. Baker CSR, Hall RJC, Evans TJ, Pomerance A, Macclouf J, Creminon C et al. Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 Mar; 19(3):646–55.
94. Schönbeck U, Sukhowa GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 1999 Oct;155(4):1281-91.
95. Stemme V, Swedenborg J, Claesson H, Hansson GK. Expression of cyclo-oxygenase-2 in human atherosclerotic carotid arteries. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2000 Aug;20:146–152.
96. FitzGerald GA, Smith B, Pedersen AK, Brash AR. Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation. *N Engl J Med*. 1984 Apr;310(17):1065–8.

97. Roy L, Knapp HR, Robertson RM, FitzGerald GA. Endogenous biosynthesis of prostacyclin during cardiac catheterization and angiography in man. *Circulation*. 1985 Mar;71(3):434-40.
98. Schönbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 1999 Oct;155(4):1281-91.
99. Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation*. 2000 Aug;102:840-5.
100. Llavaneras A, Ramamurthy NS, Heikkilä P, Teronen O, Salo T, Rifkin BR, et al. A combination of a chemically modified doxycycline and a bisphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats. *J Periodontol*. 2001 Aug;72(8):1069-77.
101. Achong R, Nishimura I, Ramachandran H, Howell TH, Fiorellini, Karimbux N. Membrane type (MT) 1- matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 expression in ligature-induced periodontitis in the rat. *J Periodontol*. 2003 Apr;74(4):494-500.
102. Galvão MPA, Chapper A, Rösing CK, Ferreira MBC, Souza MAL. Methodological considerations on descriptive studies of induce periodontal diseases in rats. *Pesq Odontol Bras*. 2003 Jan-Mar;17(1):56-62.
103. Buduneli E, Vardar S, Buduneli N, Berdeli AH, Türkoglu O, Baskesen A, et al. Effects of combined systemic administration of low-dose doxycycline and alendronate on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2004 Nov;75(11):1516-23.
104. Dumitrescu AL, Abd-El-Aleem S, Morales-Aza B, Donaldson LF. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *J Clin Periodontol*. 2004 Aug;31(8):596-603.
105. Behal N, Kanvar S, Sharma P, Sanyal SN. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drug etoricoxib on the hematological parameters and enzymes of colon and kidney. *Nutr Hosp*. 2009 May-Jun;24(3):326-32.
106. LV PP, Fan Y, Chen WL, Shen YL, Zhu L, Wang LL, et al. Cox-2 inhibitor nimesulide protects rat heart against oxidative stress by improving endothelial function and enhancing NO production. *Sheng Li Xue Bao*. 2007 Oct;59(5):674-80.
107. Granger DL, Hibbs JB Jr, Perfect JR, Durack DT. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. *J Clin Invest*. 1990 Jan;85(1):264-73.

108. Björnsson MJ, Velschow S, Stoltze K, Havemose-Poulsen A, Schou S, Holmstrup P. The influence of diet consistence, drinking water and bedding on periodontal disease in Sprague-Dawley rats. *J Periodontol Res.* 2003 Dec;38(6):543-50.
109. Rona G, Chappel CI, Balazs T, Gaudry R. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *AMA Arch Pathol.* 1959 Apr;67(4):99-111.
110. Clarke NG, Hirsch RS. Personal risk factors for generalized periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1995 Feb;22(2):136-45.
111. Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2002;29:177-206.
112. Noguchi K; Ishikawa I. The roles of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂ in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2007;43:85-101.
113. Holzhausen M, Rossa Jr C, Marcantonio Jr E, Nassar PO, Spolidório DMP, Spolidório LC. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2002;73:1013-6.
114. Herrera BS, Martins-Porto R, Campi P, Holzhausen M, Teixeira AS, Mendes GD et al. Local and cardiorenal effects of periodontitis in nitric oxide-deficient hypertensive rats. *Arch Oral Biol.* 2011;56(1):41-7.
115. Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. *Biomed Biotechnol.* 2011 Feb;754857. Epub 2011 Feb 10. Review.
116. Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental animal models in periodontology: a review. *Open Dent J.* 2010 Apr;29:(4)37-47.
117. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol* 1991; 62(1): 59-73.
118. Kimura S, Nagai A, Onitsuka T, Koga T, Fujiwara T, Kaya H et al. Induction of experimental periodontitis in mice with *Porphyromona gingivalis* – adheres ligaturas. *J Periodontol.* 2000 Jul;71:1167-73.
119. Souza DM, Prado FA, Prado MA, Rocha RF, Carvalho YR. Evaluation of periodontal bone loss in rats for radiographic and morphometric methods. *Braz J Periodontol* 2011; 21(3): 67-73.
120. Azoubel MCF, Sarmiento VA, Cangussú V, Azoubel E, Bittencourt S, Cunha FQ et al. *J Periodontol.* 2008 Sep;79:1719-1725.

121. Funk CD, FitzGerald GA. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007; 50(5):470-9.
122. Balzary RW, Cocks TM. Lipopolysaccharide induces epithelium- and prostaglandin E₂- dependent relaxation of mouse isolated trachea through activation of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2. *JPET* 2006; 317:806-12.
123. Queiroz-Junior CM, Pacheco CMF, Maltos KLM, Caliari MV, Duarte IDG, Francischi JN. Role of systemic and local administration of selective inhibitors of cyclo-oxygenase 1 and 2 in an experimental model of periodontal disease in rats. *J Periodont Res.* 2009;44:153-60.
124. Martina SD, Vesta KS, Ripley TL. Etoricoxib: a highly selective COX-2 inhibitor. *Ann Pharmacother.* 2005;39:854-62.
125. Trelle S, Reichenbach S, Eandel S, Hildebrand P, Tschannen B, Villiger PM *et al.* Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. *BMJ.* 2011;342:c7086.
126. Fernandes D, Striechen TM, Farias JM ; Olchanheski JR LR, Sordi R, Velloso JCR, Santos FA, Brito LCW. Book of Abstracts: 10th World Congress on Inflammation. In: 10th World Congress on Inflammation, 2011, Paris. *Inflammation Research.* 2011;60:S216.
127. Leitão RFC, Ribeiro RA, Chaves HV, Rocha FAC, Lima V, Brito GAC. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2005;76:956-63.
128. Pourageaud F, Leblais V, Bellance N, Marthan R, Muller B. Role of β_2 -adrenoceptors (β -AR), but not β_1 -, β_3 -AR and endothelial nitric oxide, in β -AR-mediated relaxation of rat intrapulmonary artery. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2005;372:14-23.
129. Guimarães S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* 2001; 53(2):319-56.
130. Graves J, Poston L. β -Adrenoceptor agonist mediated relaxation of rat isolated resistance arteries: a role for the endothelium and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 1993; 108:631-7.
131. Ribeiro DA, Butts JB, Oshima CTF, Bergameschi CT, Campos RR. Ascorbic acid prevents acute myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: role of inducible nitric oxide synthase production. *J Mol Hist.* 2009;40:99-105.
132. Patel V, Upaganlawar A, Zalawadua R, Balaraman. Cardioprotective effect of melatonin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats: a biochemical, electrocardiographic and histomorphological evaluation. *Eur J Pharmacol.* 2010 Oct;644(1-3):160-8.

133. Hou Y, Huang C, Cai X, Zhao J, Guo W. Improvements in the establishment of a rat myocardial infarction model. *J Int Med Res*. 2011;39(4):1284-92.
134. Tanwar V, Sachdeva J, Golechha M, Kumari S, Arya DS. Curcumin protects rat myocardium against isoproterenol-induced ischemic injury: attenuation of ventricular dysfunction through increased expression of Hsp27 alongwith strengthening antioxidant defense system. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010 Apr;55(4):377-84.
135. Heather LC, Catchpole AF, Stuckey DJ, Cole MA, Carr CA, Clarke K. Isoproterenol induces *in vivo* functional and metabolic abnormalities; similar to those found in the infarcted rat heart. *J Physiol Pharmacol*. 2009 Sep;60(3):31-9.
136. Kitagawa Y, Yamashita D, Ito H, Takaki M. Reversible effects of isoproterenol-induced hypertrophy in situ left ventricular function in rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Mar;287:277-85.
137. Sitia S, Tomasoni L, Azteni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Ver*. 2010 Oct;9(12):830-4.

**ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DO
USO DE ANIMAL**



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 05/2010

Título - –“Efeito do etoricoxib na reatividade vascular de animais com periodontite induzida por ligadura”

Interessado – Dr. Daniel Fernandes

Data de Entrada – 02/06/2010

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – Validade de dois anos para projetos de pesquisa.
06/07/2012

Considerações

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos para utilização de duzentos e dez (210) ratos (*Rattus norvegicus*).

- Processo cadastrado sob o número: 08272

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 06/07/2012

Professor Dr. Giovani Marino Favero
Coordenador Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264