

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANA PAULA PRESTES

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES B₁ E B₂ PARA CININAS
EM ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS E CARDIOVASCULARES SISTÊMICAS
INDUZIDAS PELA PERIODONTITE**

PONTA GROSSA
2016

ANA PAULA PRESTES

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES B₁ E B₂ PARA CININAS
EM ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS E CARDIOVASCULARES SISTÊMICAS
INDUZIDAS PELA PERIODONTITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes
Coorientador: Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco

PONTA GROSSA
2016

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor Tratamento da Informação BICEN/UEPG

P936 Prestes, Ana Paula
Avaliação do envolvimento dos receptores B_1 e B_2 para cininas em alterações inflamatórias e cardiovasculares sistêmicas induzidas pelo periodontite/ Ana Paula Prestes. Ponta Grossa, 2016.
124 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes

Coorientador: Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco

1. Cininas. 2. Receptores B_1 e B_2 . 3. Periodontite. I. Fernandes, Daniel.
II. Franco, Gilson Cesar Nobre. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Mestrado em Ciências Farmacêuticas. IV.T

CDD : 615.1

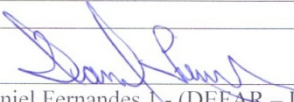
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS –
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCIÊNCIAS
APLICADAS À FARMÁCIA, NÚMERO DA ATA 09/2016, DA MESTRANDA ANA PAULA
PRESTES REALIZADO NO DIA 30 DE MARÇO DE 2016, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE PONTA GROSSA.

Aos trinta dias de março de dois mil e dezesseis, às 14h00min na sala 115, bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência do Professor Doutor Daniel Fernandes reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Ana Paula Prestes na linha de pesquisa: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicada à Farmácia / Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fisiopatológicos, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Profa. Dra Márcia Thaís Pochapski e Lea Rosa Chioca Ferro. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem a defesa de dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título do trabalho foi: Avaliação do Envolvimento dos Receptores B₁ e B₂ para Cininas em Alterações Inflamatórias e Cardiovasculares Sistêmicas Induzidas pela Periodontite. Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se APROVADA a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 60 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

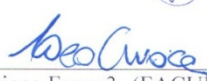
Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____


Daniel Fernandes 1 - (DEFAR - DEPG) - Presidente


Márcia Thaís Pochapski 2 - (ODONTO - UEPG) – Titular


Lea Rosa Chioca Ferro 3 - (FACULDADES PONTA GROSSA) – Titular

Ponta Grossa, 30 de março de 2016.

“Quem não sabe o que busca, não identifica o que acha”

Immanuel Kant

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Daniel Fernandes, pela orientação, auxílio e amizade.

Aos colegas de laboratório, Msc. Luiz Renato Olchanheski, Msc. Willian Moreira Machado, Dra. Reila Mendes, Msc. Vanessa Kovalski e Dra. Regina de Sordi, aos alunos de iniciação científica Daiandra Colarites, Jheniffer Lara e Gustavo Alves. Pelos auxílios científicos, experimentais e especialmente pela amizade e apoio.

Ao prof. Dr. Fábio André dos Santos pela participação no exame de qualificação e por disponibilizar alguns equipamentos e reagentes para a realização dos experimentos.

Ao prof. Dr. Michel Otuki e a profa. Dra. Kátia Sabrina Paludo pela participação no exame de qualificação e auxílio com o anticorpo para a realização do experimento de western-blotting.

Ao prof. Dr. Gilson César Nobre Franco pela coorientação, auxílio experimental e pelo momento muito valioso de experiência em docência nas disciplinas de Fisiopatologia.

As funcionárias do biotério, Maria da Luz da Silva Pereira e Marilene Terezinha Barbosa, pela disponibilidade, amizade e auxílio com o manejo dos animais.

Ao LabNO da Universidade Federal de Santa Catarina, em especial ao prof. Dr. Jamil Assrey e a Adriane Madeira, pela doação do kit de TNF- α .

A minha amiga Marina Magnini, pelas conversas científicas e pelo auxílio prestado nesse projeto.

Aos meus pais José Luiz Prestes e Vera do Rocio Vanat Prestes. Em especial, a minha mãe, amiga e professora pelos ensinamentos que me transmitiu ao longo da minha vida. Onde um ser humano verdadeiro é um ser de sabedoria, humildade, simplicidade, esperança e amor.

Aos meus irmãos Andréia do Rocio Prestes, Rosa Cristina Prestes e Eduardo Prestes. Juntos somos o alicerce de nossas vidas.

Aos amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências-Farmacêuticas e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

A Universidade Estadual de Ponta Grossa, em especial ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Por fim, a Deus, em todas as suas formas e crenças, que nos faz vivos e nos proporciona a jornada da liberdade; onde os caminhos vividos nos conduzem para a contemplação da existência divina.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

PRESTES, A.P. AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES B₁ E B₂ PARA CININAS NAS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS E CARDIOVASCULARES SISTÊMICAS INDUZIDAS PELA PERIODONTITE. 2016. 124f. Qualificação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2016.

Processos inflamatórios estão associados ao aumento dos níveis plasmáticos de bradicinina (BK) e de seus metabólitos des-Arg⁹-bradicinina (DABK) e des-Arg¹⁰-Lys-bradicinina. A ação das cininas é mediada pela ativação dos receptores B₁ e B₂. A BK age preferencialmente a partir da estimulação dos receptores B₂ constitutivos. Em contrapartida, os metabólitos da BK atuam nos receptores B₁ que são expressos somente em tecidos que sofreram trauma prévio ou infecção. Estudos propõem que a ação dos receptores B₁ esteja correlacionada a processos inflamatórios crônicos tais como a periodontite. Desta maneira, o propósito deste trabalho foi investigar a participação dos receptores B₁ e B₂ para cininas na inflamação sistêmica e nas alterações cardiovasculares induzidas pela periodontite em ratos. Quatorze dias após a colocação de ligaduras para a indução da periodontite ou realização do procedimento de falso-operado, os animais foram submetidos ao experimento de edema de pata para diferentes agentes flogísticos – carragenina, BK, DABK, serotonina, histamina e prostaglandina E₂. Além da avaliação edematogênica, a migração de células polimorfonucleares e a permeabilidade vascular no tecido da pata foram avaliadas após a indução do edema de pata mediado por carragenina. No mesmo intervalo de tempo realizou-se a avaliação das alterações na pressão arterial média para os agonistas dos receptores B₁ e B₂. Os níveis plasmáticos e teciduais (tecido da pata) de TNF- α e IL- β foram quantificados após três, sete e quatorze dias da indução da periodontite. A quantificação protéica do receptor B₁ para cininas foi realizada 14 dias após a indução da periodontite. Os resultados obtidos para o procedimento de edema de pata mediado por carragenina demonstraram um aumento estatisticamente significativo no edema, na migração de células polimorfonucleares e na permeabilidade vascular nos animais do grupo ligadura. Nenhuma diferença entre os grupos ligadura e falso-operado foram observadas no edema de pata induzido por serotonina, histamina e prostaglandina E₂. Nenhuma diferença entre os grupos ligadura e falso-operado foram observadas no edema de pata induzido por BK. Interessantemente, o grupo ligadura apresentou um aumento estatisticamente significativo no edema de pata induzido por DABK. Dessa maneira, o edema induzido por DABK caracterizou a participação dos receptores B₁ no edema de pata no grupo ligadura, mas não foi observada uma alteração na quantificação protéica deste receptor entre os grupos experimentais. As alterações na pressão arterial média induzidas pelos agonistas da BK e DABK foram similares. Os níveis plasmáticos de TNF- α foram superiores no grupo ligadura após 3 dias da indução da periodontite. Em contrapartida, os níveis teciduais de IL-1 β foram superiores no grupo ligadura. Os dados obtidos sugerem que a periodontite pode promover alterações na resposta inflamatória em tecidos distantes da cavidade oral. Dessa maneira, as alterações nos parâmetros inflamatórios podem alterar a ativação dos receptores B₁ e esses receptores contribuirão nas alterações inflamatórias sistêmicas induzidas pela periodontite.

Palavras-chave: Cininas, receptores B₁ e B₂, periodontite.

ABSTRACT

PRESTES, A.P. **INVOLVEMENT OF B₁ AND B₂ KININ RECEPTORS IN INFLAMMATORY AND CARDIOVASCULAR CHANGES INDUCED BY PERIODONTITIS**. 2016. 124f. Qualificação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2016.

The inflammatory process is associated with increased plasma levels of bradykinin (BK) and its metabolites des-Arg⁹-bradykinin (DABK) and des-Arg¹⁰-lys-bradykinin. The kinins effects are mediated through B₁ and B₂ receptors activation. BK acts preferentially in the constitutive B₂ receptors. In contrast, BK metabolites act in the B₁ receptors that are expressed only in tissues that have undergone previous trauma or infection. Studies suggest that the action of the B₁ receptor is correlated to chronic inflammatory processes such as periodontitis. Thus, the purpose of this study was to investigate the involvement of B₁ and B₂ kinin receptors in systemic inflammation and cardiovascular changes induced by periodontitis in rats. Fourteen days after the induction of periodontitis by ligature placement or sham procedure, animals were underwent to the paw edema procedure induced for different phogistic agents – carragenan, BK, DABK, serotonin and prostaglandin E₂. In addition to the paw edema procedure the migration of polymorphonuclear cells and vascular permeability changes were evaluated after carrageenan-induced paw edema. In the same period of time the assessment of changes in mean arterial pressure for B₁ and B₂ receptors agonists were determinate. The plasma and tissue levels (paw tissue) of TNF- α and IL-1 β were quantified after three, seven and fourteen days of periodontitis induction. The protein quantification (western-blotting) of B₁ receptor was determinate after fourteen days of periodontitis induction. The results obtained for paw edema procedure mediated by carrageenan demonstrated a statistically significant increase in the edema, polymorphonuclear cells migration and vascular permeability in the ligature group. No differences between the ligature and sham group were observed in paw edema induced by serotonin, histamine and prostaglandin E₂. No differences between the ligature and sham group were observed in BK-induced paw edema. Interestingly, the DABK-induced paw edema was increased at ligature group. Therefore the increase at edema induced by DABK-indicate the activation of the B₁ receptors in the paw edema in ligature group, but changes in protein quantification of B₁ receptor were not observed between experimental groups. The changes in blood pressure induced by BK and DABK agonist were similar. The plasma levels of TNF- α were higher in the ligature group after three days of periodontitis induction. In contrast, tissue levels of IL-1 β were higher in the ligature group. The data suggest that periodontitis can promote changes in inflammatory response in tissues distant from oral cavity. Thus, alterations in inflammatory parameters can increase the expression of B₁ receptors, and these receptors may contribute in the systemic inflammatory changes induced by periodontitis.

Keywords: Kinins, B₁ and B₂ receptors, periodontitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	Esquema da formação e metabolismo dos elementos do sistema KKS.....	24
FIGURA 2 -	Mecanismos de sinalização celular correlacionados ao processo de indução dos receptores B ₁ para cininas.....	27
FIGURA 3 -	Patologias sistêmicas correlacionadas ao sistema KKS.....	28
FIGURA 4 -	Mecanismos de vasodilatação endotelial induzidos pela ativação dos receptores B ₁ e B ₂ para cininas.....	32
FIGURA 5 -	Interconexão entre os mecanismos vasoativos do sistema KKS e do sistema RAS.....	33
FIGURA 6 -	Manipulação da migração de neutrófilos ao epitélio gengival induzida pela <i>P. gingivalis</i>	37
FIGURA 7 -	Subversão da resposta imune oral mediada pelo microrganismo <i>P. gingivalis</i>	39
FIGURA 8 -	Contribuição da infecção periodontal no processo aterosclerótico.....	43
FIGURA 9 -	Representação esquemática dos objetivos centrais do trabalho	48
FIGURA 10 -	Indução da periodontite por meio de ligaduras.....	52
FIGURA 11 -	Exame morfométrico da perda óssea alveolar média.....	53
FIGURA 12 -	Representação do preparo do animal para a avaliação dos parâmetros cardiovasculares e administração dos agentes vasoativos.....	56
FIGURA 13 -	Resumo esquemáticos protocolos experimentais.....	63
FIGURA 14 -	Avaliação da perda óssea alveolar média (mm) induzida pelo modelo experimental de periodontite.....	65
FIGURA 15 -	Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite por meio do edema de pata mediado por carragenina (100 µg/pata).....	66
FIGURA 16 -	Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite por meio do edema de pata mediado por BK (3 nmol/pata).....	67
FIGURA 17 -	Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite a partir do edema de pata medidado por DABK (30 nmol/pata).....	68
FIGURA 18 -	Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite a	

	partir do edema de pata mediado por serotonina (5 nmol/pata)	69
FIGURA 19 -	Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite a partir do edema de pata mediado por histamina (10 nmol/pata)	70
FIGURA 20 -	Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite a partir do edema de pata mediado por prostaglandina E ₂ (1 nmol/pata).....	71
FIGURA 21 -	Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite a partir da análise da A.U.C. do edema de pata mediado por BK (3 nmol/pata), DABK (30 nmol/pata), 5-HT (5 nmol/pata), His (10 nmol/pata) e PGE ₂ (1 nmol/pata).....	72
FIGURA 22 -	Avaliação da migração de neutrófilos por meio da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase.....	73
FIGURA 23 -	Avaliação da permeabilidade vascular a partir do extravasamento do corante azul de Evans.....	74
FIGURA 24 -	Avaliação de parâmetros cardiovasculares (pressão arterial média basal e frequência cardíaca) em modelo experimental de periodontite.....	75
FIGURA 25 -	Avaliação de parâmetros cardiovasculares induzidos pela reatividade vascular do receptor B ₂ para cininas.....	76
FIGURA 26 -	Avaliação de parâmetros cardiovasculares induzidos pela reatividade vascular do receptor B ₁ para cininas.....	77
FIGURA 27 -	Avaliação de parâmetros cardiovasculares induzidos pela reatividade vascular do receptor B ₁ para cininas.....	78
FIGURA 28 -	Avaliação dos níveis plasmáticos de TNF- α após 3, 7 e 14 dias da indução da periodontite.....	80
FIGURA 29 -	Avaliação dos níveis teciduais de TNF- α após 14 dias da indução da periodontite.....	81
FIGURA 30 -	Avaliação dos níveis plasmáticos de IL-1 β após 3, 7 e 14 dias da indução da periodontite.....	81
FIGURA 31 -	Avaliação temporal dos níveis plasmáticos de IL-1 β após 3, 7 e 14 dias da indução da periodontite.....	82
FIGURA 32 -	Avaliação dos níveis teciduais de IL-1 β após 14 dias da indução da periodontite.....	83

FIGURA 33 -	Quantificação protéica do receptor B ₁ para cininas no tecido da pata.....	83
FIGURA 34 -	Ilustração esquemática dos achados experimentais.....	96

TABELAS

TABELA 1 -	Agonistas e antagonistas dos receptores B ₁ e B ₂ para cininas e suas aplicações clínicas.....	29
TABELA 2 -	Estudos clínicos que correlacionam a periodontite com alterações inflamatórias sistêmicas.....	41
TABELA 3 -	Estudos clínicos que correlacionam a periodontite com alterações cardiovasculares.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

KKS	Sistema cininogênio-calícreína-cininas
DK	Calidina
BK	Bradicinina
DABK	Des-Arg ⁹ -bradicinina
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
HK	Cininogênio de alto peso molecular
XIIa	Fator XII ativado
LK	Cininogênio de baixo peso molecular
ECA	Enzima conversora da angiotensina
Phe-Arg	Fenilalanina-arginina
PLC-β	Fosfolipase C-β
IP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
Ca ⁺²	Íons cálcio
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
PKC	Proteína quinase C
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
IL	Interleucina
TNF-α	Fator de necrose tumoral - α
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NF-κB	Fator nuclear kappa B
MAPK	Proteína quinase ativa por mitógenos
PI3-K	Inositol trifosfato
AP-1	Proteína ativadora - 1
CREB	Proteína ligante ao elemento de resposta da 3'5'-adenosina monofosfato cíclico
AKT/PKB	Proteína quinase B
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
JNK	Quinase ativada por mitógenos
TLR	Receptor <i>Toll</i>
NO	Óxido nítrico
PGI ₂	Prostaciclina

COX-2	Ciclooxigenase 2
NK1	Neurocinina 1
NK3	Neurocinina 3
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular – 1
EDHF	Fator relaxante derivado do endotélio
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
K ⁺	Íons potássio
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
RAS	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
iECA	Inibidores da enzima conversora da angiotensina
MMPs	Metaloproteinases de matriz
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
SerB	Serina fosfatase
C5a	Fração C5 do complemento ativada
TLR2	Receptor <i>Toll-like 2</i>
C5aR	Receptor da fração C5 ativada do complemento
MyD88	Proteína de diferenciação de respsota mielóide primária 88
DCVs	Doenças cardiovasculares
AVC	Acidente vascular cerebral
PCR	Proteína C reativa
PAI-1	Inibidor 1 do ativador do plasminogênio
DP	Periodontite
PAF	Fator de ativação plaquetária
SAA	Proteína amilóide A sérica
LDL-ox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LPS	Lipopolissacarídeo
FimA	Fimbria A
TLR4	Receptor <i>Toll-like 4</i>
DC-SIGN	Imunoglobulina não-integrina captadora de moléculas de adesão específica de células dendríticas
DC	Células dendríticas
SMC	Células musculares lisas vasculares
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa

DBCA	Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimental Animal
DALBK	des-lys-Arg ⁹ -bradicinina
MPO	Enzima mieloperoxidase
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
S.E.M.	Média ± erro padrão da média
ANOVA	Análise de variância
5-HT	Serotonina
His	Histamina
IFN-γ	Interferon-γ
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
RANKL	Receptor ativador do fator nuclear kappa B

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	FISIOLOGIA DO SISTEMA CININOGENIO-CALICREÍNA-CININAS.....	23
2.1.1	Formação e metabolismo dos elementos do sistema KKS.....	23
2.1.2	Receptores B ₁ e B ₂ para cininas.....	25
2.1.3	Mecanismos de indução dos receptores B ₁ para cininas.....	26
2.2	PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES B ₁ E B ₂ EM PROCESSOS FISIOPATOLÓGICOS.....	28
2.2.1	Funções fisiopatológicas dos receptores B ₁ e B ₂ em processos inflamatórios.....	29
2.2.2	Funções fisiopatológicas dos receptores B ₁ e B ₂ em processos cardiovasculares.....	31
2.3	A PERIODONTITE E SEUS IMPACTOS SISTÊMICOS.....	35
2.3.1	Associação da doença periodontal e patologias sistêmicas.....	35
2.3.2	A periodontite como um processo disbiótico.....	36
2.3.3	Periodontite – Da inflamação sistêmica ao dano aterosclerótico.....	39
2.4	CONTRIBUIÇÃO DO SISTEMA DE CININAS NA INFLAMAÇÃO INDUZIDA PELA PERIODONTITE.....	45
3	OBJETIVOS.....	48
3.1	Objetivo geral.....	48
3.2	Objetivo específico.....	49
4	MATERIAIS EM MÉTODOS.....	51
4.1	ANIMAIS.....	51
4.2	COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS.....	51
4.3	INDUÇÃO DA PERIODONTITE POR MEIO DE LIGADURAS.....	51
4.4	AVALIAÇÃO DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR – EXAME MORFOMÉTRICO.....	52
4.5	AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA.....	53
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE.....	54
4.7	AVALIAÇÃO DO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO –	

	PERMEABILIDADE VASCULAR PARA O AGENTE EDEMATOGÊNICO CARRAGENINA.....	54
4.8	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES.....	55
4.9	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS E TECIDUAIS DE TNF- α E IL-1 β	56
4.10	WESTERN-BLOTTING PARA O RECEPTOR B ₁ PARA CININAS.....	57
4.10.1	Preparo das amostras.....	57
4.10.2	Eletroforese em gel de sulfato dodecil de sódio (SDS)/poliacrilamida..	57
4.10.3	Transferência e revelação.....	57
4.11	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	58
4.11.1	Protocolo 1 – Variáveis inflamatórias: Avaliação inflamatória do edema de pata induzido por carragenina, BK, serotonina, histamina e PGE ₂	58
4.11.2	Protocolo 2 – Variáveis inflamatórias: avaliação do antagonismo B ₁ (DALBK) no edema de pata induzido pelo agonista DABK.....	59
4.11.3	Protocolo 3 – Inflamação: Avaliação da migração de neutrófilos por meio da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase.....	59
4.11.4	Protocolo 4 – Inflamação: Avaliação do extravasamento plasmático – permeabilidade vascular para o agente edematogênico carragenina...	60
4.11.5	Protocolo 5 – Inflamação: Avaliação do estado inflamatório sistêmico induzido pela periodontite.....	61
4.11.6	Protocolo 6 – Variáveis cardiovasculares: Avaliação da resposta de agonistas dos receptores B ₁ e B _{2q}	62
4.11.7	Protocolo 7: Western-blotting para o receptor B ₁ para cininas.....	62
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
5	RESULTADOS	65
5.1	PERDA ÓSSEA ALVEOLAR MÉDIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE – CARACTERIZAÇÃO DA INSTALAÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL.....	65
5.2	AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA – CARACTERIZAÇÃO DA INFLAMAÇÃO	

	SISTÊMICA INDUZIDA PELA PERIODONTITE.....	65
5.3	AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR BRADICININA – CARACTERIZAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR B ₂ NA INDUÇÃO DO EDEMA DE PATA.....	66
5.4	AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DES-ARG ⁹ - BRADICININA – CARACTERIZAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR B ₁ NA INDUÇÃO DO EDEMA DE PATA.....	67
5.5	AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DE AGENTES EDEMATOGENICOS NÃO RELACIONADOS AO SISTEMA DE CININAS NO QUADRO INFLAMATÓRIO SISTÊMICO INDUZIDO PELA PERIODONTITE.....	68
5.5.1	Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite a partir do edema de pata mediado por serotonina (5-HT).....	69
5.5.2	Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite a partir do edema de pata mediado por histamina (His).....	69
5.5.3	Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite a partir do edema de para mediado por prostaglandina E ₂	70
5.6	COMPARATIVO DA CONTRIBUIÇÃO DOS AGENTES EDEMATOGENICOS RELACIONADOS E NÃO RELACIONADOS AO SISTEMA DE CININAS NO QUADRO INFLAMATÓRO SISTÊMICO INDUZIDO PELA PERIODONTITE.....	71
5.7	AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS POR MEIO DA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE.....	72
5.8	AVALIAÇÃO DO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO – PERMEABILIDADE VASCULAR PARA O AGENTE EDEMATOGENICO CARRAGENINA.....	74
5.9	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELA REATIVIDADE VASCULAR AOS COMPONENTES DO SISTEMA DE CININAS FRENTE AO ESTADO INFLAMATÓRIO CRÔNICO INDUZIDO PELA PERIODONTITE.....	75

5.10	AVALIAÇÃO DO ESTADO INFLAMATÓRIO SISTÊMICO INDUZIDO PELA PERIODONTITE – QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS E TECIDUAIS DE TNF- α E IL1- β	80
5.11	AVALIAÇÃO DO ESTADO INFLAMATÓRIO SISTÊMICO INDUZIDO PELA PERIODONTITE – QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS TECIDUAIS DO RECEPTOR B ₁ PARA CININAS.....	83
6	DISCUSSÃO	85
6.1	CONTRIBUIÇÃO DO SISTEMA DE CININAS NAS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS INDUZIDAS PELA PERIODONTITE.....	85
6.2	CONTRIBUIÇÃO DO SISTEMA DE CININAS NAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS PELA PERIODONTITE.....	97
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
8	REFERÊNCIAS	105
9	ANEXO A	124

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Patologias de origem microbiana que afetam a cavidade bucal tais como gengivite e periodontite, apresentam elevada prevalência na população em geral (DEMMER et al., 2008). Além do dano local à cavidade bucal, recentes estudos observacionais e revisões demonstram um significativo aumento no número de doenças cardiovasculares e inflamatórias sistêmicas, tais como aterosclerose, hipertensão e artrite reumatóide, entre pessoas com doença periodontal (CUNHA-CRUZ; NADANOVSKY, 2003). Os mecanismos biológicos da relação entre periodontite, doenças inflamatórias e cardiovasculares não estão totalmente elucidados. Acredita-se que a inflamação sistêmica produzida pela microbiota presente na doença periodontal seja o elo da relação entre estas patologias.

Diversas linhas de pesquisa demonstram a participação das cininas e seus receptores em uma lista crescente de funções fisiológicas e condições fisiopatológicas (MARCEAU et al., 1998). A participação do sistema de cininas na periodontite surge como uma possibilidade de correlação do processo inflamatório sistêmico e das alterações cardiovasculares induzidas pela doença periodontal (TURNER et al., 2001). Destaca-se a importância da avaliação da participação dos receptores B₁ para cininas no processo inflamatório sistêmico induzido pela periodontite.

Além da relação entre inflamação sistêmica e periodontite o estudo visou avaliar a participação do sistema de cininas nas alterações cardiovasculares induzidas pela doença periodontal. Este foco de estudo correlaciona-se com as alterações na função endotelial promovidas pela inflamação sistêmica decorrente da periodontite. Desta forma, a avaliação da participação do sistema de cininas, em especial os receptores B₁ e B₂ na função endotelial, torna-se um importante foco de estudo para a elucidação das alterações do processo de vasodilatação endotélio-dependente induzidos pela periodontite.

A partir da inflamação sistêmica promovida pela periodontite e das evidências experimentais do papel dos receptores B₁ em processos inflamatórios crônicos, o propósito deste trabalho foi investigar a participação dos receptores B₁ e B₂ para cininas no processo inflamatório sistêmico e nas alterações cardiovasculares promovidas pela periodontite em modelo experimental de doença periodontal induzida por ligaduras em ratos.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os primeiros relatos científicos do sistema cininogênio-caliceína-cininas (KKS) datam de 1909. Ao detectar a presença de uma substância hipotensiva, denominada uro-hipotensina (SHARMA et al., 1996), na urina humana, Abelous e Bardier iniciaram a pesquisa científica da formação, metabolismo e ação fisiológica do sistema de cininas. Em 1926, ao avaliar o efeito de injeções intravenosas de secreção pancreática e de urina em cães normotensos anestesiados, Frey e colaboradores observaram que ambas as substâncias produziam redução da pressão arterial. Baseando-se na hipótese de que ambas as substâncias eram idênticas fisiologicamente, estes pesquisadores a denominaram de caliceína, da palavra "*kallikrêas*" que significa pâncreas (KUHR et al., 2010).

Werle et al. (PRADO et al., 2002), ao avaliar a atividade da caliceína no músculo liso, descobriram que a caliceína isolada não causava contração do íleo isolado de cobaia. Estes investigadores observaram que quando a caliceína era incubada no plasma, uma substância liberada dessa associação, promovia a contração do músculo liso. Assim, concluiu-se que esta substância não era resultante da caliceína, mas um produto de proteínas plasmáticas. Este agente foi inicialmente denominado de substância DK que posteriormente recebeu a denominação de calidina (DK).

No Brasil, Rocha e Silva, Beraldo e Rosenfeld (1949) descobriram que, por meio da incubação do plasma de cães com o veneno da serpente *Bothrops jararaca* ou com a enzima tripsina, uma substância provavelmente um polipeptídeo, promovia redução da pressão arterial e causava, *in vitro*, uma contração lenta do íleo isolado de cobaia. Esta nova substância foi denominada de bradicinina (BK), do grego "*bradys*" e "*kinesia*" (COSTA-NETO et al., 2008). Sabendo que a BK e a calidina formam-se em condições similares e apresentam as mesmas atividades fisiológicas, foi sugerido que ambas estariam correlacionadas e derivariam de uma mesma substância (PRADO et al., 2002).

Rocha e Silva, em 1956, realizou a purificação da BK (HAWGOOD; GUTTMANN, JAQUENOUD, 1997), mas a sequência de aminoácidos foi determinada em 1960 por Boissonnas et al. (1960). Nos anos de 1970 as pesquisas sobre o sistema de cininas concentraram-se nos efeitos fisiológicos da BK e de seus análogos, conectando-os a múltiplos processos fisiológicos tais como o controle da

pressão arterial, contração e relaxamento do músculo liso, respostas inflamatórias e indução de nocicepção e hiperalgesia (LEEB-LUNDBERG et al., 2005).

Contribuindo com a investigação dos efeitos fisiológicos do sistema de cininas, Regoli e Barabé (1980) descreveram as respostas fisiológicas da BK e de seu análogo des-Arg⁹-bradicinina (DABK) em uma variedade de tecidos. Estes pesquisadores propuseram que as respostas fisiológicas das cininas eram mediadas por dois receptores de membrana distintos, que variavam na expressão tecidual e na ação fisiológica, denominando-os de receptores B₁ e B₂ para cininas (REGOLI; BARABÉ, 1980).

A caracterização molecular dos receptores B₁ e B₂ iniciou-se entre os anos 1980 e 1990, culminando em 1991 com a clonagem do DNA do receptor B₂ realizada por Jarnagin e colaboradores (MCEACHERN et al., 1991). A caracterização das vias de sinalização celular que medeiam os efeitos fisiológicos dos receptores B₁ e B₂ também contribuiu para a investigação dos efeitos fisiológicos e patológicos do sistema de cininas (HIGASHIDA et al., 1986; BURSCH; AXELROD, 1987). No mesmo período, Palmer, Ferrige e Moncada (1987) descreveram a importância da BK como um potente estimulador da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), via ativação dos receptores B₂.

Nas últimas duas décadas, diversas linhas de pesquisa demonstraram que as cininas e seus receptores estão envolvidos em uma lista crescente de funções fisiológicas e condições fisiopatológicas (MARCEAU; HESS; BACHVAROV, 1998). Patologias tais como dor inflamatória crônica, sepse, angioedema e asma apresentam uma participação proeminente da BK e de seus metabólitos. Desta forma, a busca científica de agonistas e antagonistas dos receptores B₁ e B₂ pode culminar futuramente no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos correlacionados ao sistema de cininas (HOWL; PAYNE, 2003; ZAUSINGER, 2003).

Atualmente, as principais áreas de investigação e desenvolvimento de terapêuticas correlacionadas ao sistema KKS são a fisiopatologia da dor, patologias do sistema cardiovascular, do sistema respiratório e do câncer (LEEB-LUNDBERG et al., 2005). Em paralelo a investigação fisiopatológica do sistema de cininas, estudos químicos e farmacológicos contribuem com o delineamento de agonistas e/ou antagonistas dos receptores B₁ e B₂ que futuramente possam contribuir para o tratamento terapêutico de patologias relacionadas ao sistema de cininas (AKBARY; WIRTH, SCHOLKENS, 1996; PROUD et al., 1995).

2.1 FISIOPATOLOGIA DO SISTEMA CININOGENIO-CALICREÍNA-CININAS

Processos inflamatórios estão associados ao aumento dos níveis plasmáticos de BK e seus metabólitos (des-Arg⁹-BK e des-Arg¹⁰-Lys-BK). Cininas, incluindo a BK e DK que são gerados no plasma sanguíneo e em uma variedade de tecidos periféricos em resposta a dano tecidual ou infecção (CAMPOS; SOUZA; CALIXTO, 1996).

As cininas em geral, são reconhecidas como potentes peptídeos vasoativos que promovem dilatação venular, aumento da permeabilidade do endotélio vascular a fluidos e proteínas plasmáticas resultando na formação de edema, dor e hiperalgesia (CAMPOS; SOUZA; CALIXTO, 1998, 1999). Além disso, a BK e seus metabólitos são responsáveis por muitos efeitos em leucócitos; estimulando a liberação de mediadores inflamatórios o que inclui citocinas, prostaglandinas, leucotrienos e espécies reativas de oxigênio (CAMPOS et al., 2002).

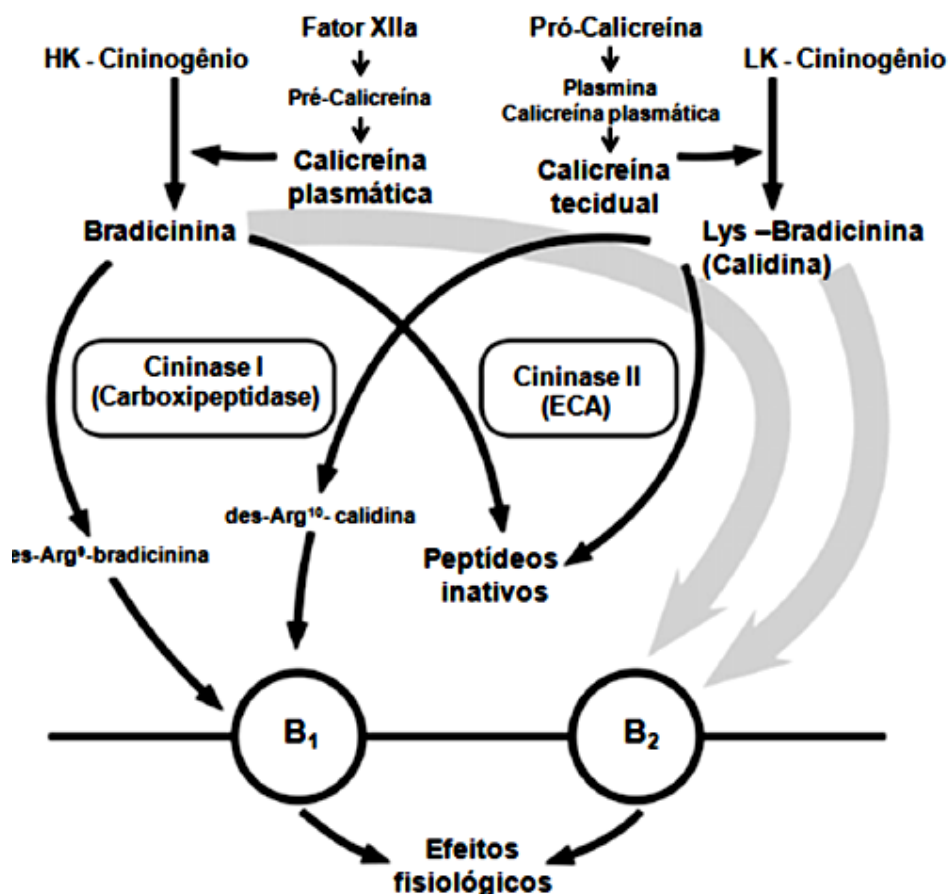
2.1.1 Formação e metabolismo dos elementos do sistema KKS

Existem duas vias pelas quais as cininas são formadas, a via de ativação dependente da calicreína plasmática e a via de ativação dependente da calicreína tecidual (SAXENA et al., 2011). A calicreína plasmática é uma serina protease sintetizada nos hepatócitos na forma de molécula inativa denominada de pré-calicreína (BHOOLA; FIGUEROA; WORTHY, 1992). Esta enzima circula no plasma sanguíneo ligada ao cininogênio de alto peso molecular (HK). O contato do plasma com superfícies macromoleculares de carga negativa leva a ativação do fator XII (Fator Hageman) (KAPLAN; JOSEPH; SILVERBERG, 2002). O fator XII ativado (XIIa) converte a pré-calicreína em calicreína, e esta enzima cliva o HK em BK. Esta etapa da cascata de ativação das cininas também está correlacionada ao início da via intrínseca da coagulação e da via do complemento (MAURER et al., 2011).

A calicreína tecidual e o cininogênio de baixo peso molecular (LK) são os elementos constituintes da via de tecidual de formação de cininas (SHARMA, 2006). Esta enzima é uma glicoproteína ácida que está presente em vários tecidos incluindo rins, vasos sanguíneos, sistema nervoso central, glândulas salivares, glândulas adrenais e neutrófilos. A calicreína tecidual é sintetizada intracelularmente na forma de uma pró-enzima denominada de pró-calicreína (PROUD, 1988). Por

meio da estimulação decorrente da ação da plasmina ou da caliceína plasmática, a pró-caliceína é convertida em caliceína tecidual que cliva o LK em DK (FIGURA 1) (SAINZ et al., 2007).

FIGURA 1 – Esquema da formação e metabolismo dos elementos do sistema KKS



Fonte: Adaptado de SAXENA, P.; et al. Kallikrein-kinin system: a surgical perspective in post-aprotinin era. *Journal of Surgical Research*. v. 167, n. 1, p. 70-77. 2011.

As cininas são metabolizadas nos fluidos extracelulares, na circulação sanguínea e intracelularmente a partir da ação de enzimas denominadas de cininases. As enzimas que clivam as cininas na posição amino-terminal são as aminopeptidases M que degradam a calidina em BK e as aminopeptidases P, que clivam o primeiro aminoácido da BK para formar a BK – (2-9) (SHARMA; AL-SHERIF, 2006). As enzimas responsáveis pela degradação carboxiterminal das cininas são divididas em cininases I, que inclui a carboxipeptidase M e N e em cininases II, que incluem a enzima conversora de angiotensina (ECA) e a

endopeptidase N. As cininases I metabolizam a BK e a DK a partir da remoção de um resíduo arginina (Arg) carboxi-terminal gerando os metabólitos des-Arg⁹-BK e des-Arg¹⁰-DK (ERDOS, 1990). As cininases II metabolizam as cininas pela remoção de um resíduo fenilalanina-arginina (Phe-Arg) carboxi-terminal da BK e da DK gerando respectivamente, BK (1-7) e KD (1-8). Estes resíduos são posteriormente clivados pela ECA em BK (1-5) e KD (1-6) (SHEIKH; KAPLAN, 1986).

2.1.2 Receptores B₁ e B₂ para cininas

Uma vez formadas, as cininas exercem seus efeitos biológicos por meio da ativação de dois receptores de membrana acoplados a proteínas G, denominados de receptores B₁ e B₂ (CALIXTO et al., 2004). Os receptores B₂ são distribuídos de maneira constitutiva na maioria dos tecidos e apresentam elevada afinidade pela BK e DK. Em contrapartida, os receptores B₁ apresentam alta afinidade pelos metabólitos DABK e lys-des-Arg⁹-BK. Estes receptores não são expressos constitutivamente, mas tornam-se expressos em condições desencadeadas por estímulos inflamatórios, infecção e trauma (BHOOLA, 1992).

Ambos os receptores para cininas foram clonados e classificados como membros da subfamília “*rhodospin-like*” de receptores acoplados a proteína G (KUHR et al., 2010). Sendo que, a ativação os receptores B₁ e B₂ contribui para a promoção de respostas intracelulares e intercelulares que variam de acordo com o tipo celular e tecidual (PRADO et al., 2002).

Os receptores para cininas acoplam-se as proteínas G $\alpha_{q/11}$ e G α_i (BLAUKAT; DIKIC, 2001). A ativação dos receptores B₁ e B₂ acarreta na estimulação da via de sinalização celular mediada pela fosfolipase C- β (PLC- β), resultando na formação subsequente dos segundos mensageiros inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃), diacilglicerol e cálcio (Ca⁺²) (NISHIZUKA, 1992).

O aumento intracelular de Ca⁺² ativa a via de sinalização dependente da guanosina monofosfato cíclico (cGMP) acarretando na produção de óxido nítrico (NO) (PRADO et al., 2002). O diacilglicerol e o Ca⁺² podem ativar diferentes isoformas de proteínas quinases C (PKC), que ativadas, participam de inúmeros vias de sinalização que controlam a proliferação celular (LEED-LUNDBERG et al., 2005). A ativação dos receptores B₁ e B₂ também acarreta na estimulação das fosfolipases A₂ (PLA₂) e D, resultado no aumento intracelular das concentrações de segundos

mensageiros derivados do ácido araquidônico, com produção subsequente de prostaglandinas (BLAUKAT; DIKIC, 2001).

Apesar de que as vias de sinalização intracelular decorrentes da ativação dos receptores B₁ e B₂ serem semelhantes, elas apresentam importantes diferenças nos aspectos de tempo de ativação e dessensibilização do referido receptor (LAMB et al., 2002). Enquanto os receptores B₂ promovem uma sinalização transiente acompanhada de rápida dessensibilização, os receptores B₁ promovem respostas fisiológicas prolongadas e pouco sujeitas a dessensibilização (LEED-LUNDBERG et al., 2001). Estes fenômenos justificam-se pelas diferenças na cinética de aumento das concentrações intracelulares de Ca⁺² e pela rápida dessensibilização dos receptores B₂ via fosforilação e internalização. Estas atribuições moleculares justificam a ativação dos receptores B₂ em condições agudas e a ativação dos receptores B₁ em condições crônicas (ENQUIST et al., 2007).

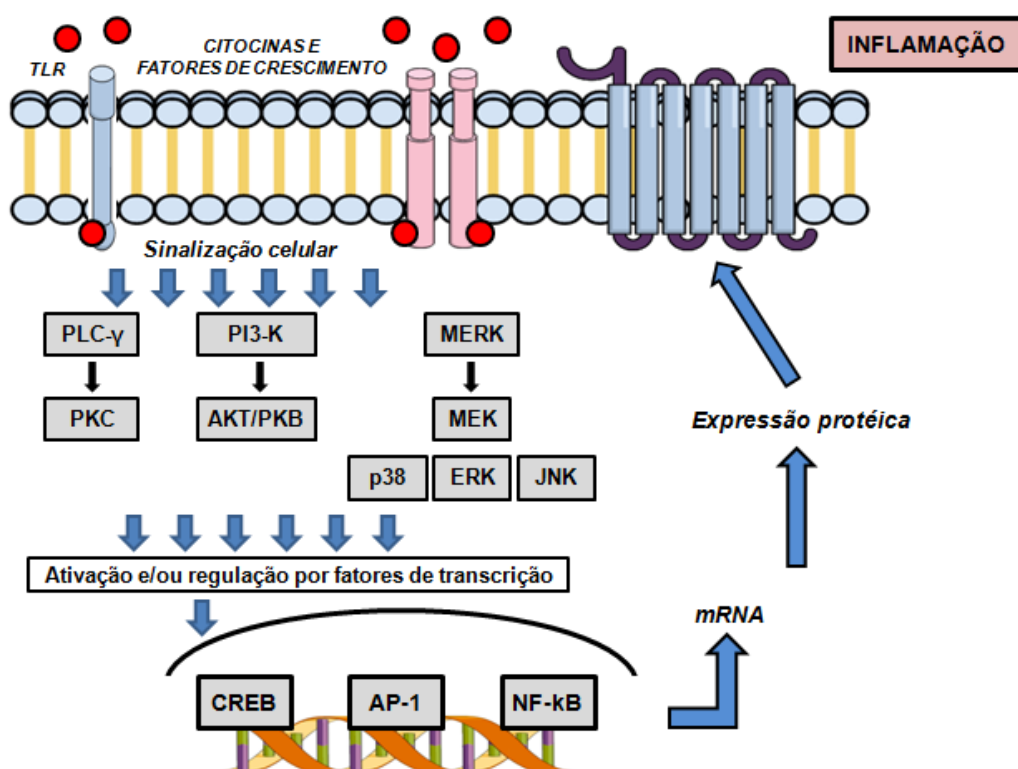
2.1.3 Mecanismos de indução dos receptores B₁ para cininas

A indução dos receptores B₁ foi primeiramente descrita por Regoli et al. (1977). Estes pesquisadores observaram que o agonista B₁ (DABK) promovia vasoconstrição da aorta isolada de coelho após 2-3 horas de incubação do tecido em tampão fisiológico (REGOLI; BARABÉ; PARK, 1977). Este fenômeno foi atribuído a síntese *de novo* dos receptores B₁, pois a resposta não foi observada nos tecidos tratados com inibidores de transcrição de RNA, inibidores de translocação e maturação de proteínas (MARCEAU; HESS, BACHVAROV, 1998).

A indução da expressão dos receptores B₁ ocorre *in vitro* e *in vivo*, a partir da participação de citocinas específicas liberadas em situações de trauma, infecção e inflamação; incluindo a interleucina 1-β (IL-1β) e o fator de necrose tumoral α (TNF-α) (DEBLOIS; BOUTHILLIER; MARCEAU, 1988). Adicionalmente, estudos *in vitro* demonstram que certas citocinas e fatores de crescimento (interleucina-2, interferon-γ, fator de crescimento epidérmico e oncostatina) aumentam a taxa de indução dos receptores B₁ (LEVESQUE et al., 1995). De todas as citocinas a IL-1β é a principal indutora da expressão dos receptores B₁ em diferentes tipos celulares, atuando no aumento da expressão do mRNA deste receptor em nível transcricional e pós-transcricional (SCHANSTRA et al., 1998; TSUKAGOSHI et al., 1999).

A investigação dos mecanismos moleculares correlacionados a indução dos receptores B₁, demonstra uma importante participação neste processo do fator nuclear kappa B (NF-κB). Schanstra et al. (1998), identificaram a existência de domínios de ligação para NF-κB em regiões promotoras do gene correspondente ao receptor B₁. Zhou, Polgar e Taylor (1998) demonstraram que a indução dos receptores B₁, via IL-1β e TNF-α correlaciona-se diretamente a ativação do NF-κB (ZHOU; POLGAR; TAYLOR, 1998). Phagoo, Poole e Leeb-Lundberg (1999) verificaram que a ativação dos receptores B₂ pode constituir um estímulo direto para a indução do receptor B₁. Esta hipótese correlaciona-se com a evidência experimental de que agonistas dos receptores B₂ podem causar a ativação do NF-κB (FIGURA 2) (SCHANSTRA et al., 1999).

FIGURA 2 – Mecanismos de sinalização celular correlacionados ao processo de indução dos receptores B₁ para cininas



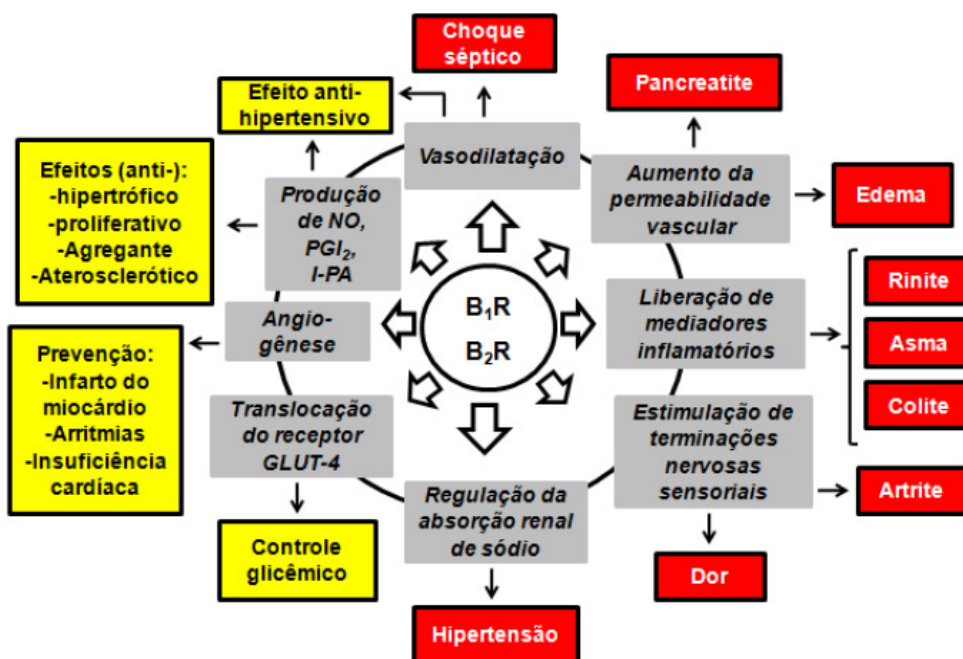
Nota: Estímulos inflamatórios e infecciosos podem induzir diferentes vias de sinalização celular incluindo as proteínas MAPK, PKC e PI3-K, que podem modular diferentes fatores de transcrição (NF-κB, AP-1 e CREB). Esses fatores de transcrição regulam a expressão dos receptores B₁. AKT/PKB (proteína quinase B), AP-1 (proteína ativadora-1), CREB (proteína ligante ao elemento de resposta de resposta do 3'5'-adenosina monofosfato cíclico), ERK (quinase regulada por sinal extracelular), JNK (quinase ativada por mitógenos), NF-κB (fator nuclear kappa B), IP3-K (inositol trifosfato), PLC (fosfolipase C), PKC (proteína quinase C), TLR (receptor toll). Fonte: Adaptado de CALIXTO, J.B.; et al. Kinin B₁ receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *British Journal of Pharmacology*. v. 143, n. 7, p. 803-818. 2004.

Estudos recentes demonstraram que no processo de indução dos receptores B_1 ocorre significativa ativação de proteínas quinases. Larrivee et al. (1998) foram os primeiros pesquisadores a descrever que a indução dos receptores B_1 mediada por $IL-1\beta$ e $TNF-\alpha$ envolve a ativação de proteínas PKC, tirosinas quinases e quinases regulados por sinal extracelular (ERK) (CAMPOS et al., 2002). Dados recentes demonstraram que, no tecido vascular, as proteínas quinases ativas por mitógenos (MAPK) e as quinases c-Jun NH₂-terminal (JNK) contribuem para a expressão do mRNA do receptor B_1 (MEDEIROS et al., 2004). Juntos, esses dados demonstram a importância das proteínas quinases, da mediação inflamatória via citocinas e da participação dos receptores B_2 na indução dos receptores B_1 .

2.2 PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES B_1 E B_2 EM PROCESSOS FISIOPATOLÓGICOS

Nas últimas décadas, a investigação dos constituintes do sistema KKS e dos receptores para cininas, demonstra que este sistema está correlacionado a diversas condições fisiopatológicas (FIGURA 3) (LEEB-LUNDBERG et al., 2005).

FIGURA 3 – Patologias sistêmicas correlacionadas ao sistema KKS



Fonte: NO (Óxido nítrico), PGI₂ (Prostaciclina), I-PA. Adaptado de MAURER, M.; et al. New topics in bradykinin research. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v. 66, n. 11, p. 1397-1406. 2011.

Pouco é conhecido sobre a importância clínica da ativação dos receptores para cininas em humanos. Mas, a participação deste sistema já é caracterizada em diferentes patologias tais como rinite alérgica, cirrose, doenças cardíacas, traumas cerebrais, doença de Alzheimer, asma, pancreatite e choque séptico (COSTA-NETO et al., 2008; SHARMA; AL-SHERIF, 2006). Sabendo-se disso, diversos agonistas e antagonistas para os receptores B₁ e B₂ estão em fase de desenvolvimento farmacêutico e investigados laboratorialmente e clinicamente quanto a eficiência clínica e aplicações terapêuticas (TABELA 1).

Tabela 1 – Agonistas e antagonistas dos receptores B₁ e B₂ para cininas e suas aplicações clínicas

Fármaco	Aplicação	Fase da investigação	Referência
Labradimil (Agonista do receptor B ₂)	Modulação transiente da barreira hematoencefálica	Ensaios clínicos	Saaber et al. (2014)
Icatibant (Antagonista do receptor B ₂)	Dor inflamatória Angioedema hereditário Edema vasogênico	Uso clínico aprovado para o tratamento do angioedema	Bas et al. (2015)
Deltibant (Antagonista do receptor B ₂)	Sepse	Resultados negativos em ensaios clínicos	Fein et al. (1997)
Sar-[d-Phe ⁸]-des-Arg ⁹ -BK (Agonista do receptor B ₁)	Angiogênese e vasculogênese em doenças isquêmicas severas	Efeitos especulativos em humanos	Emanuelli et al. (2002)
Des-Arg ¹⁰ -Hoe 140 (Antagonista do receptor B ₁)	Alergias respiratórias	Efeitos benéficos em modelo animais, efeitos especulativos em humanos	Christiansen et al. (2002)

2.2.1 Funções fisiopatológicas dos receptores B₁ e B₂ em processos inflamatórios

Desde a descoberta da BK, diversos estudos demonstram que esse peptídeo e seus metabólitos correlacionam-se a indução dos quatro sinais de inflamação (calor, rubor, dor e tumor) (ELLIOT et al., 1960). A ativação de ambos os receptores para cininas é fundamental para o desenvolvimento e manutenção de processos inflamatórios agudos ou crônicos (KHASAR et al., 1995). Nestas situações os efeitos inflamatórios de vasodilatação, edema, dor, hiperalgesia e contração do músculo liso estão relacionados a ativação dos receptores B₂ em estados inflamatórios agudos e a ativação dos receptores B₁ em situações inflamatórias crônicas (DRAY, 1992).

A descoberta de que, em macrófagos, os receptores B₁ participam da indução e liberação de diversas interleucinas, substâncias quimioestáticas e leucotrienos, contribuiu para a caracterização de que ambos os receptores de cininas apresentam um componente pró-inflamatório mediado pela produção de citocinas (SATO et al., 1996). Sabe-se que a ativação dos receptores B₂ induz uma liberação rápida de eicosanóides e subsequentemente de prostaglandinas, provavelmente pelo aumento da expressão da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2) (BOGAR et al., 1999). Estes eventos foram primeiramente descritos para os receptores B₂, mas evidências experimentais sugerem que os receptores B₁ também estejam envolvidos na ativação dos metabólitos do ácido araquidônico (KOYAMA et al., 2000).

Somando-se a contribuição dos receptores B₁ e B₂ na indução de mediadores inflamatórios, sabe-se que a ativação dos receptores B₁ induz as três etapas do processo de recrutamento de leucócitos (rolamento, adesão celular e migração através do endotélio) (BOCKMANN; PAEGELOW, 2000). Esta função inflamatória associa-se a presença dos receptores B₁ em neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, células epiteliais, células musculares lisas e células endoteliais; sugerindo que esta subclasse dos receptores para cininas seja importante para a ativação dos componentes celulares da resposta inflamatória (BHOOLA, 2001).

Uma das funções inflamatórias mais relevantes dos receptores B₁ consiste na capacidade deste sistema de alterar o tônus vascular. Esta atividade vasodilatadora está associada a liberação de prostaglandinas e NO em decorrência da ativação endotelial do receptor B₁ (RHALEB et al., 1989). As prostaglandinas e o NO liberados durante o processo inflamatório produzem vasodilatação local, aumento regional do fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade microvascular (WEDMORE; WILLIAMS, 1981). Juntos, essas evidências fisiopatológicas sugerem que a ativação endotelial do receptor B₁ facilita o acúmulo de neutrófilos pelo aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, indicando um papel indireto no recrutamento de neutrófilos (VIANNA; CALIXTO, 1998).

Contribuindo com a hiperemia inflamatória (vasodilatação local), as cininas também interferem na estabilidade da barreira endotelial. Wojciak-Stothard e Ridley (2002) demonstraram que a estimulação das proteínas Rho pela BK promove um desequilíbrio na manutenção das junções intercelulares endoteliais facilitando, desta maneira a exsudação de fluidos protéicos.

Além das ações inflamatórias indiretas descritas, recentes estudos sugerem que a ativação do receptor B₁ diretamente estimula o tráfico de neutrófilos (DUCHENE; AHLUWALIA, 2009). Esta função inflamatória correlaciona-se com a ativação dos receptores B₁ localizados em fibras nervosas sensoriais do tipo C que ao serem ativadas induzem a liberação local de substância P (AHLUWALIA; PERRETTI, 1996). Esse mediador induz por meio da estimulação dos receptores endoteliais de neurocininas (NK1 e NK3) a indução do processo de recrutamento de neutrófilos pelo aumento da expressão das moléculas de adesão de leucócitos LFA-1 (CD11a/CD18b) (MCLEAN; AHLUWALIA; PERRETTI, 2000).

Figuerola et al. (2014) demonstraram que a ativação dos receptores B₁ para cininas aumenta a expressão das moléculas de adesão intracelular-1 (ICAM-1), das integrinas Mac-1 e LFA-1 e da quimiocina CXCL5, indicando que o próprio receptor B₁ é capaz de contribuir com a indução do recrutamento de neutrófilos (DUCHENE et al., 2007). Desta maneira o desenvolvimento farmacológico de agonistas/antagonistas dos receptores B₁ e B₂ torna-se de especial interesse no tratamento de condições patológicas tais como o edema vasogênico, o angioedema hereditário e outras situações clínicas onde a mediação inflamatória do sistema de cininas esteja envolvida na patogênese da moléstia em questão (KAPLANSKI et al., 2002; ZAUSINGER et al., 2003).

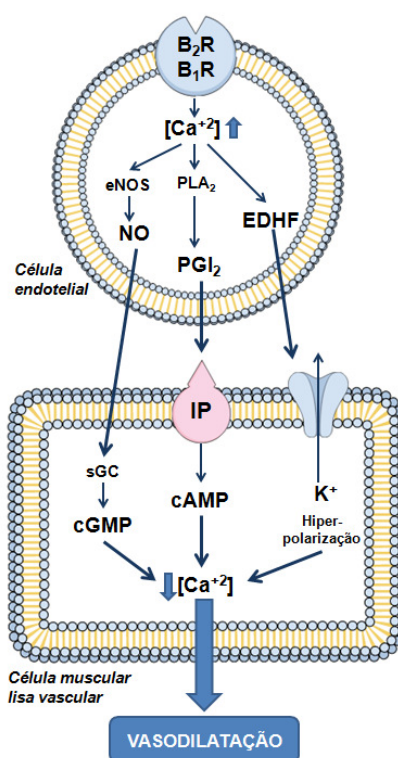
2.2.2 Funções fisiopatológicas dos receptores B₁ e B₂ em processos cardiovasculares

Sabe-se atualmente que a BK e seus metabólitos peptídicos são mediadores fisiológicos efetivos no controle e manutenção do tônus vascular (REGOLI; PLANTE; GOBEIL JR, 2012). As cininas atuam como agentes vasodilatadores produzidos e liberados localmente na superfície endotelial. Essa capacidade parácrina da BK faz com que as cininas sejam um dos sistemas fisiológicos que atuam na manutenção do fluxo sanguíneo garantindo assim a adequada oxigenação aos tecidos corporais (SHARMA, 2006).

As atividades cardiocirculatórias das cininas, em especial a vasodilatação da musculatura lisa vascular, são mediadas pela ativação dos receptores B₁ e B₂. As cininas estimulam a síntese de NO, de PGI₂ e do fator relaxante derivado do endotélio (EDHF) via ativação dos receptores B₁ e B₂ presentes nas células

endoteliais (MCLEAN; PERRETTI; AHLUWALIA, 2000). Cada um desses agentes pode agir em segundos mensageiros distintos, respectivamente, cGMP para o NO, cAMP para as prostaciclina e íons potássio (K^+) para o EDHF. Além dessa via de ativação, acredita-se que os receptores B_1 induzem a síntese de NO por uma via dependente da ativação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (FIGURA 4) (REGOLI; GOBEIL JR, 2015).

FIGURA 4 – Mecanismos de vasodilatação endotelial induzidos pela ativação dos receptores B_1 e B_2 para cininas



Nota: A ativação dos receptores B_1 e B_2 nas células endoteliais induz o aumento intracelular de íons de cálcio (Ca^{+2}) com sucessiva ativação da enzima fosfolipase A_2 (PLA_2) e da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Nas células do músculo liso vascular o óxido nítrico (NO) promove o aumento intracelular das concentrações de guanosina monofosfato cíclico (cGMP). A prostaciclina (PGI_2) promove o aumento das concentrações intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (cAMP). Estes fenômenos culminam no relaxamento da musculatura lisa vascular. A hiperpolarização NO-independente de canais iônicos de potássio (K^+) na célula do músculo liso vascular também contribui para o processo de vasodilatação decorrente da ativação dos receptores para cininas. Fonte: Adaptado de LEEB-LUNDBERG, I.M.F.; et al. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacological Reviews*. v. 57, n. 1, p. 27-77. 2005.

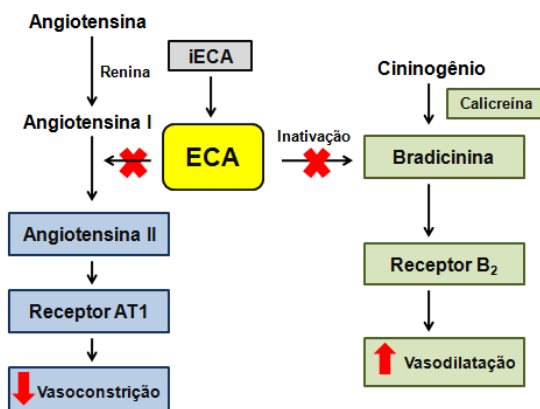
Além de sua importância fisiológica o sistema KKS é um mediador de patologias cardiovasculares destacando-se a hipertensão arterial, hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência cardíaca e isquemia do miocárdio (COSTA-NETO et al., 2008).

Amplas evidências clínicas correlacionam o sistema KKS com a patogênese da hipertensão (SHARMA, 2006; SHARMA et al., 1996). A descoberta do papel do sistema KKS na hipertensão arterial deu-se a partir da publicação de Margolius et al. (1972). Estes autores observaram que a excreção dos metabólitos das cininas era significativamente reduzida em pacientes com hipertensão. Este achado clínico-laboratorial culminou com a hipótese de que a excreção reduzida significaria uma produção reduzida dos elementos constituintes do sistema KKS (BRAUNWALD, 1997). Desta forma, a redução na formação de cininas poderia contribuir para o desenvolvimento da hipertensão (SMITH; CAMPBELL; ALBANO, 1990).

Desde a descoberta do papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAS) na patogênese da hipertensão e a introdução dos inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECA) na terapêutica cardiovascular, observou-se uma redução temporal da taxa de mortalidade em decorrência de doenças cardiovasculares (REGOLI; PLANTE; GOBEIL JR, 2012). Essa classe de medicamentos apresenta importantes benefícios terapêuticos na maioria das doenças cardiovasculares e seus mecanismos farmacológicos, além da inibição da ECA, correlacionam-se com a vasodilatação mediada pelo sistema de cininas (CAREY; PADIA, 2008).

A correlação dos iECA com o sistema de cininas ocorre em decorrência da capacidade desta classe farmacológica em inibir a biodegradação das cininas e promover o bloqueio da formação de angiotensina II (FIGURA 5) (QUITTERER; ABDALLA, 2014).

FIGURA 5 – Interconexão entre os mecanismos vasoativos do sistema KKS e do sistema RAS



Fonte: Adaptado de QUITTERER, U.; ABDALLA, S. Vasopressor meets vasodepressor: The AT1-B2 receptor heterodimer. *Biochemical Pharmacology*. v. 88, p. 284-290. 2014.

A relação das cininas nos efeitos cardioprotetivos dos iECA é demonstrada em diferentes estudos pré-clínicos e clínicos. Utilizando camundongos *knockout* para o receptor B₂, Yang et al. (2001) demonstraram que os efeitos cardioprotetivos dos iECA são perdidos. A BK também contribui para os efeitos a curto prazo dos iECA em indivíduos hipertensos e normotensos (SQUIRE et al., 2000). Witherow et al. (2001) demonstraram que em indivíduos insuficientes cardíacos tratados com iECA, a utilização de antagonistas dos receptores B₁ e B₂ produz vasoconstrição dose-dependente, confirmando a participação das cininas nos efeitos farmacológicos dos iECA.

Diversos estudos clínicos e experimentais demonstraram que as cininas apresentam efeitos cardioprotetivos em condições patológicas tais como o infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca (GROVES et al., 1995). A explicação biológica para os efeitos benéficos do sistema de cininas nestas patologias cardiovasculares baseia-se na participação dos receptores B₁ e B₂ (HASHIMOTO et al., 1978).

A ativação dos receptores B₂ promove efeitos vasodilatadores em decorrência da produção de NO pelas células endoteliais, indução de efeitos anti-proliferativos nos fibroblastos e anti-hipertróficos nos cardiomiócitos (ISHIGAI et al, 1997). Estudos demonstraram que após infarto agudo do miocárdio, os receptores B₁ para cininas tornam-se expressos no tecido cardíaco (TSCHOPE; HERINGER-WALTHER; WALTHER, 2000). Chahine e colaboradores (1993) demonstraram que a atividade cardioprotetiva da DABK em lesões isquêmicas ocorre em virtude da redução do fluxo simpático, manutenção da função endotelial e prevenção da fibrilação ventricular.

Além dos efeitos vasculares e cardíacos, o sistema KKS estimula o processo de neovascularização (EMMANUELI et al., 2000). A ativação dos receptores B₂ participa do processo de neoangiogênese a partir da sinalização celular dependente da fosforilação da Akt, aumento da enzima eNOS e indução do fator 2 de crescimento de fibroblastos (PARENTI et al., 2001). Em modelo de arteriogênese, Stone et al. (2009), demonstraram que as cininas, via receptor B₂ induzem, a proliferação de células endoteliais, células da musculatura lisa vascular e migração de pericitos. Os mesmos autores demonstraram que a calicreína independentemente dos receptores para cininas pode estimular a produção de

metaloproteinases de matriz (MMPs) que são importantes enzimas pró-angiogênicas.

2.3 A PERIODONTITE E SEUS IMPACTOS SISTÊMICOS

2.3.1 Associação da doença periodontal e patologias sistêmicas

A periodontite é uma doença inflamatória crônica que compromete os tecidos de suporte do elemento dentário, coletivamente conhecidos como periodonto. Esta patologia afeta cerca de 750 milhões de pessoas ao redor do mundo (KASSEBAUM et al., 2014) sendo que o custo anual da terapia periodontal na população norte-americana estende a cifra de 14 bilhões de dólares (HAJISHENGALLIS, 2010).

Atualmente, além das alterações locais promovidas pela periodontite, pesquisas emergentes interligam a periodontite com um variado número de patologias sistêmicas, incluindo doenças cardiovasculares, nascimento prematuro, diabetes *melittus*, infecções respiratórias, osteoporose e artrite reumatóide (WANG, 2015).

A correlação biológica entre periodontite e alterações sistêmicas, origina-se na teoria de infecção focal. Em 1891, W. Miller publicou a hipótese de que microrganismos e/ou seus produtos metabólicos seriam capazes de acessar regiões distantes do foco da infecção oral e nesses locais originar um processo patogênico levando a uma alteração fisiopatológica sistêmica (AIMETTI; ROMANO; NESSI, 2007). Até meados do final do século XX a teoria de infecção focal ficou subjugada devido a falta de evidências científicas. Mas em 1989, o interesse científico na teoria de infecção focal foi restaurado devido a publicação do estudo de Matilla e colaboradores (1989) que relacionavam a infecção dental com o infarto agudo do miocárdio.

Com esse novo impulso científico para a investigação da teoria de infecção focal, a Academia Americana de Periodontologia introduziu o termo medicina periodontal (PIZZO et al., 2010). Essa nova área de conhecimento visa-se a validação das relações biológicas entre periodontite e alterações sistêmicas por meio de estudos clínicos e modelos animais. Desta maneira, o desenvolvimento pioneiro da medicina periodontal vem ajudando a renovar a compreensão da teoria focal de infecção e aprofundar o conhecimento científico das relações entre doença

periodontal crônica e alterações sistêmicas (FITZPATRICK; WIJEYEWICKREMA; PIKE, 2009).

2.3.2 A periodontite como um processo disbiótico

Anteriormente compreendida como uma patologia decorrente da ação de patógenos individuais, dados recentes de análises metagenômicas, metatranscriptômicas e estudos mecanísticos conduzem a interpretação da periodontite como uma patologia decorrente de uma alteração disbiótica da cavidade oral (COSTALONGA; HERZBERG, 2014; WANG, 2015). Associa-se à patogênese periodontal uma dramática mudança na comunidade microbiana simbiótica, que em situações não patológicas é composta principalmente por microrganismos do gênero *Actinomyces* e *Streptococci* para uma comunidade disbiótica composta por microrganismos anaeróbicos dos filos Firmicutes, Proteobacteria, Spirochaetes, Bacteroidetes e Synergistetes (DEWHIRST et al., 2010; ABUSLEME et al., 2013).

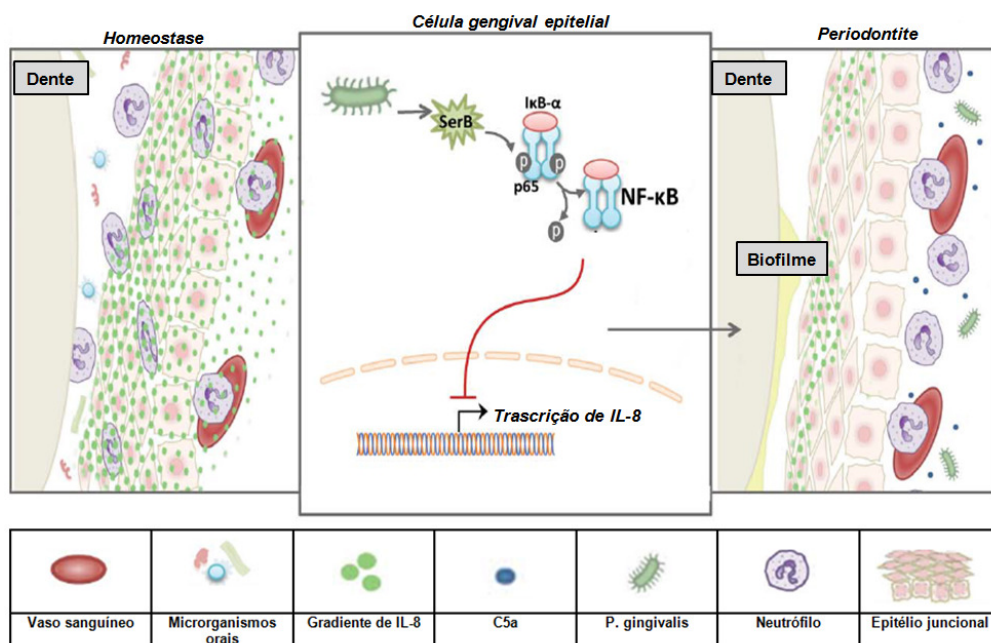
A alteração disbiótica dos constituintes microbianos da cavidade oral perturba o equilíbrio da microbiota local acarretando na perda da homeostase imuno-inflamatória do tecido periodontal (HAJISHENGALLIS, 2015). Genericamente o sinergismo polimicrobiano decorrente da disbiose do periodonto sugere que a resposta imune do hospedeiro é inicialmente subvertida pelos fatores de virulência dos periodontopatógenos. Nesse processo, os periodontopatógenos são auxiliados por microrganismos periodontais anteriormente não associados a essa patologia e subsequentemente ativados por patobiontes presentes no periodonto (ZENOBIA; HAJISHENSHENGALLIS, 2015).

Essa cadeia de interação entre a microbiota disbiótica acarreta na perda da homeostase do tecido periodontal levando, em indivíduos susceptíveis, as consequências inflamatórias destrutivas da resposta imune (MEYLE; CHAPPLE, 2015). Essas consequências caracterizam-se histologicamente pela inflamação crônica mediada pela infiltração de linfócitos B, linfócitos T e monócitos; destruição do tecido conectivo e reabsorção óssea alveolar. Além do aumento dos níveis teciduais de mediadores inflamatórios incluindo a IL-1 β , TNF- α , interleucina-6 (IL-6), prostaglandina E₂ (PGE₂) e MMPs no tecido periodontal afetado (KOLLENBRANDER, 2000).

Mecanismos moleculares específicos decorrentes do sinergismo disbiótico entre os periodontopatógenos e os patobiontes orais conduzem a manipulação das respostas imunes e inflamatórias do hospedeiro (AMANO, 2010). Diferentemente dos mecanismos imunossupressores de outros patógenos, a comunidade disbiótica periodontal necessita da inflamação tecidual como fonte de nutrição, mas precisa manipular a fagocitose mediada pelos componentes celulares do sistema imune. Para tanto, os microrganismos disbióticos periodontais apresentam a capacidade de modulação da migração e ativação de neutrófilos, subversão do sistema do complemento e modulação da resposta inflamatória da cavidade oral (MAEKAWA et al., 2014).

Os neutrófilos oriundos do epitélio juncional gengival formam uma primeira barreira de defesa celular da cavidade oral. Em decorrência disso, o epitélio gengival apresenta um gradiente estável de interleucina – 8 (IL-8), sendo essa citocina responsável pelo controle da migração de neutrófilos ao tecido gengival (FIGURA 6) (ZENOBIA; HAJISHENGALLIS, 2015).

FIGURA 6 – Manipulação da migração de neutrófilos ao epitélio gengival induzida pela *P. gingivalis*



Nota: Em condições homeostáticas os microrganismos orais são controlados imunologicamente pelo recrutamento de neutrófilos em decorrência do gradiente de IL-8 produzido pelo epitélio gengival. A *P. gingivalis* apresenta a capacidade de manipular o gradiente de IL-8 pela secreção de SerB, uma enzima que é capaz de desfosforilar a subunidade p65 do NF-κB inibindo a transcrição de IL-8. Esse processo resulta na paralisação transiente do recrutamento de quimiocinas ao epitélio gengival possibilitando a formação do biofilme dental. Fonte: Adaptado de ZENOBIA, C.; HAJISHENGALLIS, G. *Porphyromonas gingivalis* virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence*. v. 6, n. 3, p. 236-243. 2015.

Como estratégia de defesa à barreira de neutrófilos gengivais, a *P. gingivalis* ao entrar em contato com neutrófilos, especificamente nas bolsas sub-gingivais secreta uma serina fosfatase (SerB). Essa enzima inibe a produção de IL-8 por meio da desfosforilação da serina-536 da subunidade p65 do NF-kB. Essa inibição previne a translocação nuclear e transcrição do gene IL8. Tal mecanismo molecular acarreta na paralisação da sinalização celular por quimiocinas e inibição da migração de neutrófilos para o epitélio gengival (BAINBRIDGE et al., 2010; TAKEUCHI et al., 2013).

A partir desse mecanismo transiente de subversão, a colonização do periodonto pela *P. gingivalis* leva ao retardo da migração de neutrófilos ao epitélio gengival permitindo a instalação do biofilme dental, sendo a formação deste biofilme um pré-requisito fundamental para a progressão da doença periodontal (MOUTSOPOULOS et al., 2014).

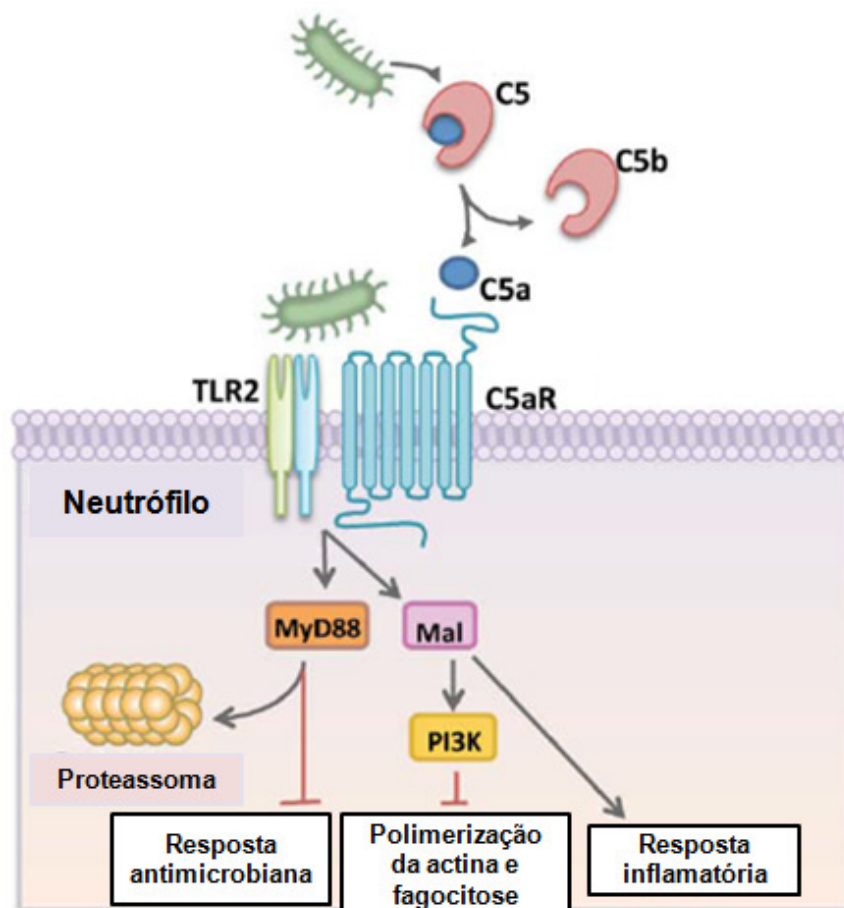
Em cooperação com a modulação dos níveis gengivais de IL-8 os microrganismos *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *P. intermédia* a partir das proteases gingipains, karilysin e interpain A, respectivamente, podem proteger-se da opsonização e fagocitose induzida pelo sistema do complemento a partir da degradação da fração C3 do complemento ou de outros componentes-chave dessa via de opsonização (HAJISHENGALLIS, 2010).

A gingipain arginina-específica da *P. gingivalis* também pode clivar a fração C5 do complemento gerando altas concentrações da fração C5 ativada (C5a) independente da ativação do sistema complemento. Em neutrófilos que reconhecem a *P. gingivalis* por meio do receptor *Toll-Like 2* (TLR2), esse patógeno pode coativar o receptor da fração C5 do complemento (C5aR) e o TLR2 levando a uma sinalização comum (WINGROVE et al., 1992). Em neutrófilos humanos a ativação C5aR-TLR2 leva a ubiquitinação e degradação proteossomal da proteína de diferenciação de resposta mielóide primária 88 (MyD88), que consiste em uma proteína adaptadora da sinalização do TLR2, essa ativação leva por fim a supressão dos efeitos antimicrobianos mediados pelo TLR2 (HAJISHENGALLIS et al., 2013).

Além disso, a interação C5aR-TLR2 ativa uma via alternativa em que a proteína adaptadora TLR-2/MyD88 (MAL) induz a sinalização da proteína fosfoinosítideo-3-quinase (PI3K), que posteriormente inibe a polimerização da actina dependente da família de Rho GTPases. A ativação da via PI3K também estimula a manutenção de uma robusta resposta inflamatória mesmo com a inibição pelos

demais mecanismos da migração de neutrófilos (FIGURA 7) (RYDER 2010; HAJISHENGALLIS et al., 2013).

FIGURA 7 – Subversão da resposta imune oral mediada pelo microrganismo *P.gingivalis*



Nota: A formação do complexo C5aR-TLR2 induzido pela *P. gingivalis* ativa a via alternativa da proteína adaptadora TLR-2/MyD88 (Mal) que induz a sinalização da proteína PI3K. Essa via inibe a polimerização da actina dependente de Rho GTPases. Por fim, a *P. gingivalis* consegue subverter as respostas fagocíticas e antimicrobianas e manter uma resposta inflamatória favorável mediada por neutrófilos. Fonte: Adaptado de ZENOBIA, C.; HAJISHENGALLIS, G. *Porphyromonas gingivalis* virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence*. v. 6, n. 3, p. 236-243. 2015.

2.3.3 Periodontite - Da inflamação sistêmica ao dano aterosclerótico

As doenças cardiovasculares (DCVs) constituem-se em um grupo de patologias do coração e dos vasos sanguíneos, incluindo hipertensão arterial, insuficiência cardíaca congestiva, doença arterial coronariana, infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral (AVC) (KHOLY; GENCO; VAN DYKE, 2015). Estas patologias são responsáveis por mais de 17,3 milhões de mortes por ano e são as

principais causas de morbidade e mortalidade ao redor do mundo (BELSTROM et al., 2012).

De acordo com os relatórios científicos da *American Heart Association*, estudos observacionais suportam a associação entre doença periodontal e doença cardiovascular, sendo a periodontite caracterizada como um fator de risco independente para a ocorrência de eventos cardiovasculares adversos (LEONG et al., 2014). A principal relação associativa entre estas patologias consiste em evidências de que, em pacientes com doença periodontal, ocorrem episódios de bacteremia transiente e aumento dos níveis plasmáticos de marcadores inflamatórios sistêmicos (HAYASHI et al., 2010).

O epitélio gengival inflamado e ulcerado torna-se porta de entrada para que os periodontopatógenos e seus fatores de virulência penetrem na circulação sistêmica (SCHENKEIN; LOOS, 2013). Para sua disseminação sistêmica os microrganismos relacionados a periodontite podem se perpetuar sistemicamente por meio da invasão celular em macrófagos, células dendríticas e células endoteliais. Além disso, estudos demonstram a ocorrência de um transporte alternativo da *P. gingivalis* mediado por eritrócitos (KEBSCHULL; DEMMER; PAPAPANOU, 2010).

Além das estratégias de perpetuação sistêmica por meio da invasão de macrófagos, células dendríticas e eritrócitos, os mediadores pró-inflamatórios (IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGE₂) produzidos localmente no tecido gengival podem extravasar na circulação sistêmica (INABA; AMANO, 2010). Esses fenômenos induzem no fígado uma resposta inflamatória de fase aguda, elevando os níveis plasmáticos da proteína C reativa (PCR), fibrinogênio, proteína amilóide A sérica e do inibidor 1 do ativador do plasminogênio (PAI-1) (HAJISHENGALLIS, 2015).

Diversos estudos clínicos indicam a ocorrência de níveis plasmáticos elevados de citocinas e proteínas de fase aguda em pacientes com periodontite (TABELA 2). Essas evidências corroboram com os mecanismos de bacteremia transiente e propagação sistêmica de mediadores pró-inflamatórios (FRIEDEWALD et al., 2009). Além disso, constata-se que o tratamento clínico e medicamentoso da periodontite reduz significativamente os níveis plasmáticos destes marcadores inflamatórios sistêmicos relacionados ao quadro patológico da doença periodontal (OFFENBACHER et al., 2009).

Tabela 2 – Estudos clínicos que correlacionam a periodontite com alterações inflamatórias sistêmicas

Referência	Objetivo	N	Achados clínicos
Gomes-Filho et al. (2011)	Avaliar a relação da periodontite (DP) crônica com os níveis plasmáticos de PCR	359	Níveis plasmáticos de PCR significativamente superiores em pacientes com PD
Nakajima et al. (2010)	Determinar os níveis plasmáticos de PCR, IL-6 e TNF- α em pacientes com DP	118	Pacientes com DP apresentaram níveis plasmáticos significativamente elevados para hsPCR e IL-6 Pacientes com DP apresentaram níveis plasmáticos significativamente reduzidos para TNF- α
Buhlin et al. (2009)	Investigar a relação da PD com níveis plasmáticos de PCR, fibrinogênio, IL-18 e IL-4	116	Níveis plasmáticos de PCR e fibrinogênio significativamente superiores em pacientes com PD Níveis plasmáticos de IL-18 e IL-4 significativamente reduzidos em pacientes com PD
Chen et al. (2010)	Avaliar a relação da DP com os níveis plasmáticos do fator de ativação plaquetária (PAF) em pacientes com ou sem histórico de DCVs	87	Pacientes com DP apresentaram níveis plasmáticos de PAF semelhantes aos níveis de pacientes com DCVs
Soder et al. (2009)	Determinar os níveis plasmáticos de MMP-9 em pacientes com DP	111	Níveis plasmáticos de MMP-9 são significativamente superiores em pacientes com DP
Glurich et al. (2002)	Investigar a relação da DP com os níveis plasmáticos de PCR, proteína amilóide A sérica (SAA), ICAM-1 e VCAM em população adulta com ou sem CAD	80	Níveis plasmáticos de PCR significativamente superiores em pacientes com PD e CAD Níveis plasmáticos de SAA significativamente elevados nos pacientes com PD e DCVs Pacientes com PD não apresentaram diferença nos níveis plasmáticos de ICAM-1 e VCAM

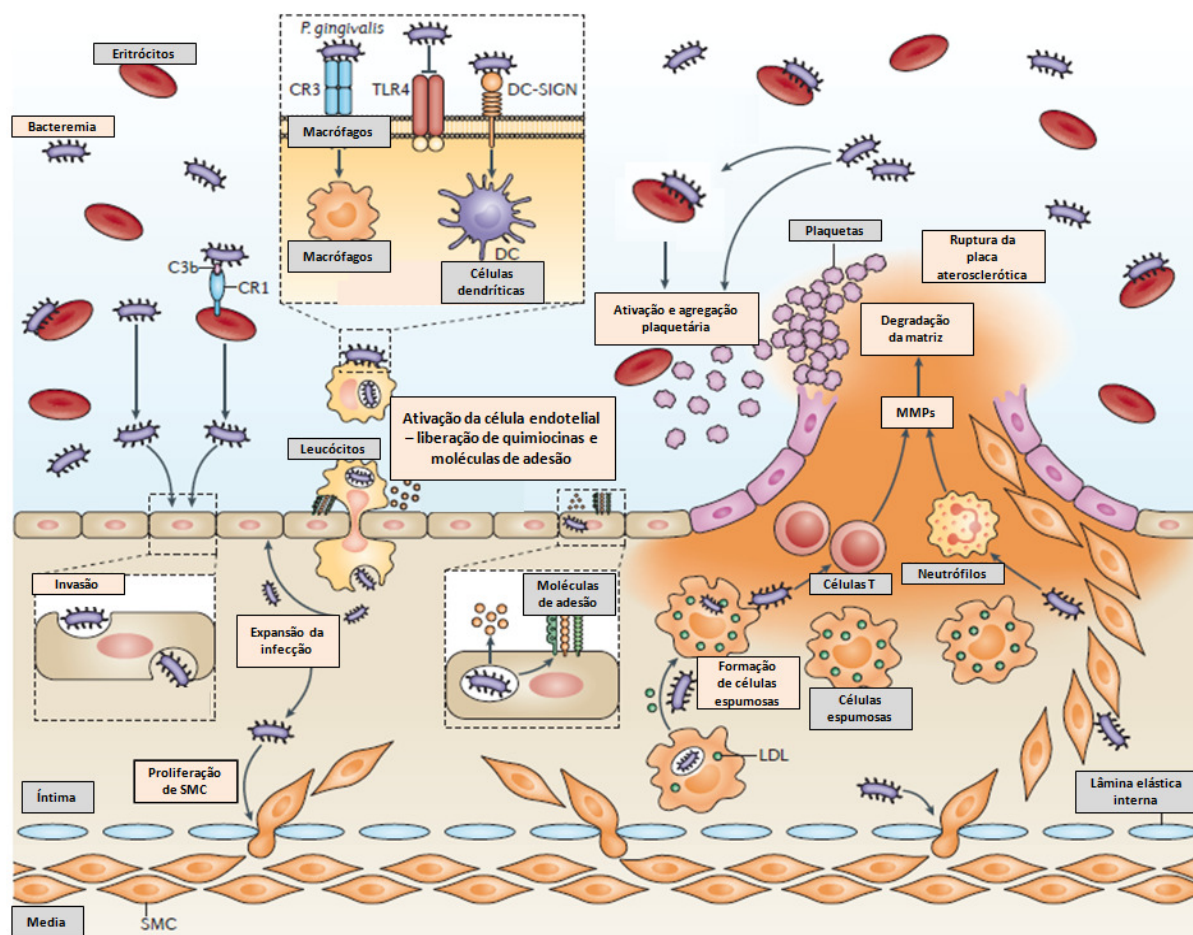
Independentemente da associação com os fatores de risco cardiovasculares tradicionais, dados recentes demonstram a ocorrência de disfunção endotelial em pacientes com periodontite (HIGASHI et al., 2008; 2009). Sabendo da importância clínica das alterações na função endotelial, acredita-se que a inflamação sistêmica induzida pela microbiota presente na doença periodontal possa contribuir para o desenvolvimento de disfunção endotelial (EKUNI et al., 2009).

Em termos gerais, disfunção endotelial refere-se ao prejuízo do endotélio em manter a homeostasia vascular (BRUNNER et al., 2005; TONETTI et al., 2007). Esse conceito, apesar de comumente associado à redução da biodisponibilidade de NO, também reflete o aumento na produção de fatores vasoconstritores, especialmente endotelina-1, e distúrbios na regulação da inflamação, trombose e crescimento celular da parede vascular (CELEMAJER et al., 1997).

Os mecanismos moleculares e celulares que relacionam a periodontite e a disfunção endotelial ainda não estão totalmente elucidados (PUSSINEN et al., 2007). Acredita-se que as substâncias inflamatórias e/ou pró-trombóticas, originárias do processo inflamatório sistêmico decorrente da periodontite, provocam alterações na vasodilatação endotélio-dependente (SAFFI et al., 2015). Fatores como a lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox), lipopolissacarídeos (LPS), IL-1, TNF- α , PCR, moléculas de adesão celular (ICAM-1, VCAM-1), fator tecidual, PAI-1, COX-2, possuem a capacidade de ativar as células endoteliais podendo assim, produzir o fenótipo endotelial disfuncional (KEBSCHULL; DEMMER; PAPAPANOU, 2010).

Somando-se a disfunção endotelial decorrente dos mediadores inflamatórios sistêmicos, estudos *in vitro* demonstram que a interação do endotélio com as fimbrias (FimA) da *P. gingivalis* induz a invasão das células endoteliais por esse microrganismo (MADRIGAL et al., 2012; HUCK et al., 2014). Esse processo invasivo induz o aumento de IL-8, de moléculas de adesão celular (ICAM-1, VCAM-1, E-selectina) e COX-2 nas células endoteliais (HAROKOPAKIS et al., 2006). Acrescenta-se a esse mecanismo a capacidade das proteínas *gingipains* da *P. gingivalis* de induzirem a apoptose das células endoteliais. Ambos os processos contribuem para o estabelecimento da disfunção endotelial e o desenvolvimento do processo aterosclerótico (FIGURA 8) (HOTCHKISS et al., 2009; POBER; MIN; BRADLEY, 2009).

Figura 8 – Contribuição da infecção periodontal no processo aterosclerótico



Nota: Para promover sua disseminação sistêmica, os periodontopatógenos podem invadir células endoteliais e leucocitárias por meio da interação com o receptor C3b-CR1 do complemento, dos receptores *Toll-like 4* (TLR4) em leucócitos e da imunoglobulina não-integrina captadora de moléculas de adesão específica de células dendríticas (DC-SIGN) em células dendríticas (DC). A invasão das células endoteliais aumenta a liberação de quimiocinas e moléculas de adesão no endotélio o que promove a migração transendotelial de leucócitos. Esses microrganismos podem invadir células musculares lisas vasculares (SMC) induzindo a proliferação deste tipo celular. A invasão microbiana em monócitos promove o aumento da captura de LDL e a formação de células espumosas. Em estágios tardios a infecção periodontal pode induzir a ruptura da placa aterosclerótica pela produção de metaloproteinases de matriz (MMPs) em neutrófilos e linfócitos. Os periodontopatógenos podem induzir agregação plaquetária o que contribui com o processo aterotrombótico. Adaptado de: HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, n. 1, p. 30-44. 2015.

Além da invasão endotelial a *P.gingivalis* possui a capacidade de invadir células leucocitárias. Essa invasão induz a migração transendotelial de monócitos infectados e o aumento da produção endotelial de TNF- α e IL-6 (ROTH et al., 2006). Os monócitos infectados com a *P.gingivalis* apresentam um aumento da capacidade de captura de LDL o que acarreta na formação de células espumosas essenciais

para a progressão aterosclerótica (LAKIO et al., 2006). Outros estudos demonstram *in vitro* a ocorrência de efeitos diretos e indiretos da *P.gingivalis* na agregação plaquetária (DELBOSC et al., 2011; NAKAYAMA, 2010). Essas evidências sugerem que a *P.gingivalis* apresenta a capacidade de acelerar o processo de aterotrombose pelo recrutamento e ativação de neutrófilos como também pela indução da agregação plaquetária via interação com as glicoproteínas IIb-IIIa das plaquetas.

Todos esses mecanismos biológicos de conexão entre a patologia periodontal e a patogênese cardiovascular são evidenciados em ensaios clínicos que demonstram uma relação moderada, mas significativa entre periodontite e DCVs (Tabela 3).

Tabela 3 – Estudos clínicos que correlacionam a periodontite com alterações inflamatórias sistêmicas

Referência	Design do estudo	N	País	Consequência cardiovascular	DCV
Holtfreter et al. (2013)	Transversal	1234	Alemanha	Disfunção endotelial	Associação significativa entre periodontite e alterações na dilatação fluxo-mediada da artéria braquial
Nakatani et al. (2013)	Transversal	513	Japão	Endocardite	A periodontite é um dos principais fatores de predisposição para a endocardite
Nesse et al. (2010)	Transversal	1208	Holanda	Hipertensão arterial	Aumento da prevalência de hipertensão arterial em pacientes com periodontite
Andriankaja et al. (2007)	Caso-controle	1461	Estados Unidos	Infarto do miocárdio não-fatal	Associação positiva entre periodontite e infarto do miocárdio não – fatal em homens e mulheres
Tu et al. (2007)	Coorte	12223	Escócia	Mortalidade em decorrência de DCV	Aumento do risco para DCV em indivíduos com perda de 9 ou mais elementos dentários
Accarini, de Godoy (2006)	Transversal	361	Brasil	Obstrução severa da artéria coronariana	Associação significativa entre doença periodontal e obstrução severa da artéria coronariana

2.4 CONTRIBUIÇÃO DO SISTEMA DE CININAS NA INFLAMAÇÃO INDUZIDA PELA PERIODONTITE

O sistema KKS, em especial os receptores B₁ e B₂ para cininas participam da patogênese da inflamação local induzida pela periodontite, contribuindo principalmente na formação do edema gengival, reabsorção do osso alveolar, modulação de mediadores pró-inflamatórios e indução de dor.

Em estudo utilizando cultura de fibroblastos gengivais humanos, Gutiérrez-Vengas e Arreguín-Cano (2011), demonstraram que a BK, via receptor B₂, induz a expressão de receptores TLR-2 como também estimulam a síntese de COX-2 e PGE₂. Na doença periodontal, a ativação dos receptores TLR-2 estimulada pela BK é de extrema importância no reconhecimento dos diferentes periodontopatógenos e na modulação da imunidade celular e síntese de citocinas.

Modéer e colaboradores (1998) observaram que em fibroblastos gengivais humanos a atividade sinérgica entre BK, IL-1 e TNF- α contribui para o aumento da síntese de IL-6. Esta correlação estaria envolvida na patogênese da periodontite em virtude de que a atividade da IL-6 estimula a liberação de linfócitos B, a produção não específica de anticorpos e a reabsorção óssea via formação de osteoclastos. Utilizando o mesmo tipo de cultura celular, Brunius e colaboradores (2005) concluíram que a atividade sinérgica entre BK, IL-1 e TNF- α também contribui para o aumento da produção de IL-8.

Brechter e colaboradores (2008) demonstraram que as citocinas IL-1 β e TNF- α , por meio das vias de sinalização mediadas pelo NF- κ B e pelas MAPKs, estimulam em tecidos conectivos a expressão de ambos os receptores para cininas. Este aumento da expressão dos receptores para cininas poderia contribuir para o mecanismo sinérgico de interação entre citocinas pró-inflamatórias e cininas na formação de prostaglandinas e na reabsorção óssea alveolar, interação essa, crucial para a inflamação crônica e reabsorção óssea induzida a partir da infecção periodontal (LERNER, 1991).

Estudos experimentais e clínicos demonstram que o sistema de cininas é fundamental na disseminação sistêmica do processo inflamatório oriunda da infecção periodontal (HU et al., 2006). A infecção pelo microrganismo *P.gingivalis* promove, após dano tecidual proteolítico, uma rápida formação de cininas. As proteinases oriundas deste microrganismo, incluindo a cisteína proteinase gingipain-

1, apresentam a capacidade de hidrolisar a enzima pré-caliceína e assim contribuir para a formação local da BK e de seus metabólitos (HOLT et al., 2000).

As cininas por si modulam muitos dos eventos observados durante o processo inflamatório periodontal, incluindo a vasodilatação local, o aumento da permeabilidade vascular, a exsudação plasmática e migração celular (IMMURA et al., 1995). Ao facilitar a disseminação sistêmica dos periodontopatógenos e de seus fatores de virulência pela barreira endotelial, as cininas contribuem para a patogênese das doenças sistêmicas correlacionadas a periodontite (RAPALA-KOZIK et al., 2011).

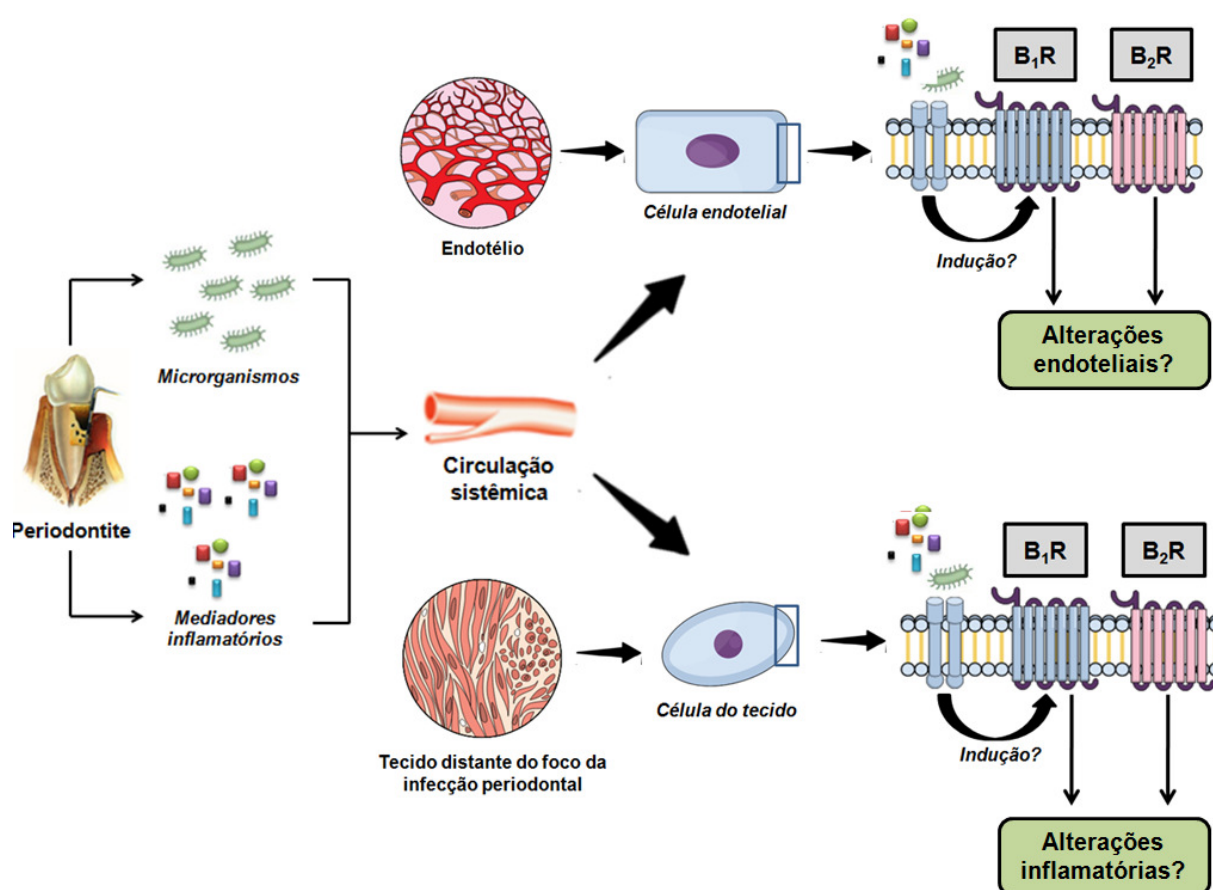
OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação dos receptores B_1 e B_2 para cininas no processo inflamatório sistêmico e em alterações cardiovasculares promovidas pela periodontite induzida em ratos (FIGURA 9).

FIGURA 9 – Representação esquemática dos objetivos centrais do trabalho



Nota: A periodontite promove um quadro de inflamação sistêmica a partir da disseminação pela circulação sistêmica dos periodontopatógenos e dos mediadores inflamatórios locais produzidos pela resposta inflamatória. O sistema de cininas, em especial os receptores B_1 e B_2 para cininas são fundamentais na fisiopatologia inflamatória e cardiocirculatória, destacando-se a capacidade de processos inflamatórios crônicos induzirem a expressão celular e tecidual dos receptores B_1 para cininas. Desta maneira o propósito deste trabalho consistiu na: 1) Avaliação da participação dos receptores B_1 e B_2 nas alterações endoteliais promovidas pela patologia periodontal. 2) Avaliação da expressão e funcionalidade inflamatória dos receptores B_1 e B_2 em um tecido distante do foco da infecção periodontal (edema de pata). Fonte: A autora.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o papel dos receptores B₁ e B₂ no processo inflamatório em um sítio distante da infecção bucal (inflamação na pata).
- Avaliar o papel dos agentes edematogênicos carragenina, serotonina, histamina e PGE₂ no processo inflamatório sistêmico induzido pela periodontite (inflamação na pata).
- Analisar a migração de neutrófilos e a permeabilidade vascular após edema de pata mediado por carragenina.
- Avaliar o papel dos receptores B₁ e B₂ em alterações cardiovasculares induzidas pela periodontite.
- Analisar os níveis plasmáticos e teciduais (tecido da pata) de TNF- α e interleucina 1- β após a indução da periodontite em diferentes tempos experimentais.
- Quantificar os níveis protéicos do receptor B₁ para cininas em um sítio distante da infecção bucal (inflamação na pata).

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* adultos, de 2-3 meses de idade, pesando entre 200 a 300 g. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Estadual da Ponta Grossa (UEPG). Os mesmos foram mantidos, durante todo o período de experimento, em ambiente com temperatura de 21 ± 2 °C e ciclo de claro/escuro (12/12h) controlado automaticamente, bem como tiveram livre acesso à água e comida (ração Nuvilab CR-1, Quimtia S.A., Canguiri, Colombo, PR, Brasil). Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEPG (005/2015) e os animais foram manipulados conforme as recomendações da diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2 COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS

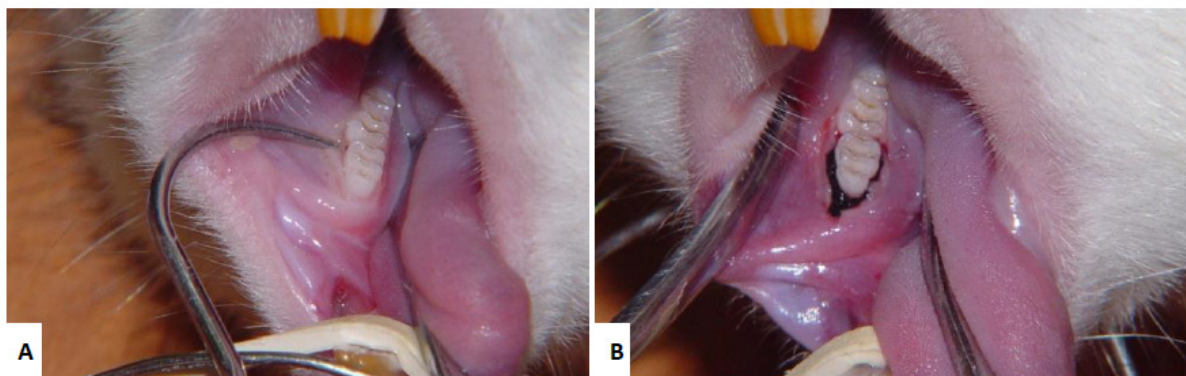
As seguintes substâncias foram utilizadas neste estudo: Quetamina (Parke-Davis, São Paulo, SP, Brasil); xilazina (Bayer, São Paulo, SP, Brasil); peróxido de hidrogênio 10v (Rioquímica Ltda, São José do Rio Preto, SP, Brasil); azul de metileno (LabMaster Ltda, Pinhas, PR, Brasil); BK, DABK, des-lys-Arg⁹-bradicinina (DALBK), serotonina, histamina, PGE₂ e carragenina tipo kappa/lambda (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); tampão fosfato de sódio, hexadeciltrimetilamônio, tetrametilbenzidina e dimetilformamida (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); reativo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, INC, EUA) e heparina sódica (Cristália Produtos Farmacêuticos, São Paulo, SP, Brasil).

4.3 INDUÇÃO DA PERIODONTITE POR MEIO DE LIGADURAS

Para o procedimento de colocação de ligaduras, os ratos foram anestesiados por via intraperitoneal, com uma combinação de quetamina (75 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg). Os animais foram posicionados em um aparato de Doku, para que permanecessem com a cavidade oral aberta. Com o auxílio de uma sonda

exploradora, os primeiros molares inferiores e segundos molares superiores dos animais foram levemente luxados (FIGURA 10, PAINEL A), para criar um espaço para a colocação das ligaduras. As ligaduras de fio de algodão (Tex34 Glacê 50 – Lipasa – Brasil) foram colocadas bilateralmente nos primeiros molares inferiores e segundos molares superiores (FIGURA 10, PAINEL B), atentando-se para que as mesmas ficassem posicionadas dentro do sulco gengival, com o nó na face mesial dos molares inferiores e na face palatina dos molares superiores (GALVÃO et al., 2003; BUDUNELI et al., 2004). Os animais do grupo falso-operado foram submetidos aos mesmos procedimentos, porém o nó não foi fixado e a ligadura foi imediatamente removida.

FIGURA 10 – Indução da periodontite por meio de ligaduras



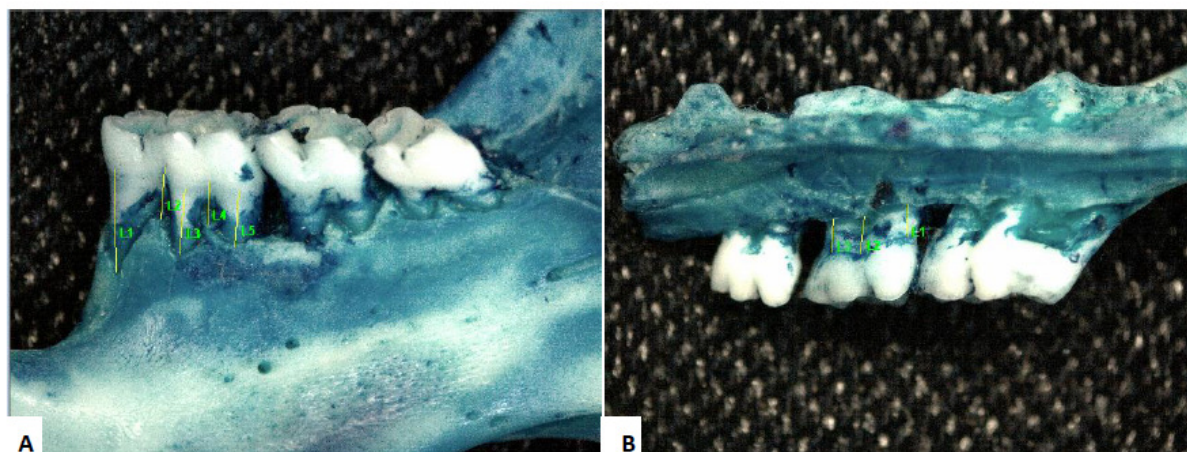
Fonte: MACHADO, W.M. *O efeito da simvastatina em alterações cardiovasculares e na perda óssea induzida pela periodontite*. 2013, 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

4.4 AVALIAÇÃO DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR – EXAME MORFOMÉTRICO

Após a eutanásia dos animais por meio de sobredose anestésica, a mandíbula e maxila foram retiradas para análise da perda óssea alveolar induzida pela ligadura e, portanto, caracterização da periodontite. O tecido gengival da região das hemi-mandíbulas e maxilas foram retirados e a parte óssea subjacente foi submetida ao procedimento de fervura em água por 30 minutos, com posterior imersão das amostras em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10v ou 3% por 12 horas. Depois das amostras estarem secas, estas foram imersas e imediatamente removidas de uma solução de azul de metileno (1 g/100 mL) para delineamento da linha da junção cemento-esmalte.

O método utilizado para quantificar a perda óssea periodontal foi adaptado de Bjornsson et al. (2003). As amostras foram fotografadas em uma Lupa Digital (ZaissStemi 2000-C, Carl Zeiss do Brasil Ltda, SP, Brasil), salvas em um computador e as medidas – das regiões linguais e vestibulares das mandíbulas e das maxilas – foram realizadas entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar. As imagens foram analisadas pelo programa Image-Pro Plus ® Version 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA), sendo consideradas cinco medidas lineares para cada face dos dentes inferiores e três medidas lineares para cada face dos dentes superiores (FIGURA 11).

FIGURA 11 – Exame morfométrico da perda óssea alveolar média



Nota: Painei A – Mandíbula, Painei B – Maxila e suas respectivas marcações lineares para mensuração da perda óssea alveolar média. Fonte: MENDES, R.T. *Efeitos cardiovasculares da inibição da ciclooxigenase 2 em um modelo experimental de periodontite induzida por ligadura*. 2012, 85f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2012.

4.5 AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA

Para a avaliação do edema de pata os animais foram submetidos à injeção intraplantar de 50 µL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) em uma das patas traseiras (pata controle), e na pata contralateral (pata teste) os animais receberam 50 µL de solução fisiológica contendo um dos agentes edematogênicos: BK (3 nmol/pata), DABK (30 nmol/pata), DALBK (200 nmol/pata), serotonina (5 nmol/pata), histamina (10 nmol/pata), PGE₂ (1 nmol/pata) ou carragenina (100 µg/pata). O edema foi mensurado a partir da utilização de balança eletrônica de precisão (Bioprecisa - Modelo BS 3000A, TDS Instrumental Ltda, SC, Brasil) nos tempos recomendados

para cada agente edematogênico (DI ROSA; SORRENTINO, 1970). O edema foi expresso em mL como diferença entre as patas teste e controle (WINTER et al., 1962).

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)

O recrutamento de neutrófilos foi quantificado indiretamente por meio da avaliação da atividade enzimática da MPO (SUKUKI et al., 1983) a partir da metodologia adaptada de Bradley (1982). O tecido da pata dos animais foi homogeneizado (T10 Basic Ultra Turrax, IKA Works, INC, USA) em solução tampão fosfato de sódio (80 mM, pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, 0,5%, p/v). O homogenato resultante foi centrifugado (20 min, 11.200 g, 4°C) e o sobrenadante utilizado para o ensaio de determinação da atividade enzimática da MPO.

A reação enzimática foi desenvolvida em triplicata utilizando-se 30 µL do sobrenadante na presença de tetrametilbenzidina (1,6 mM) em dimetilformamida e H₂O₂ (0,5 mM) totalizando um volume final de 250 µL. A reação foi realizada a 37°C por 3 min, sendo interrompida com acetato de sódio (1,46 M/ pH 3,0). A absorbância foi determinada em um leitor de placas a 630 nm (Ultra microplate reader EL 808, Bio-Tek Instruments, INC, EUA). A quantidade de proteína total do homogenato foi estimada por meio da metodologia de Bradford (BRADFORD, 1976) e os valores finais foram apresentados na forma de unidade de densidade óptica (D.O.)/mg de proteína.

4.7 AVALIAÇÃO DO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO – PERMEABILIDADE VASCULAR PARA O AGENTE EDEMATOGÊNICO CARRAGENINA

O extravasamento plasmático foi quantificado por meio do derrame do corante azul de Evans na pata (MARTIN, Y. et al., 2010). Aos animais foi administrado o corante azul de Evans (50 mg/Kg, 0,1 mL/100 g, i.v.) 30 min antes da injeção intraplantar de 50 µL de carragenina (100 µg/pata) na pata teste e de 50 µL de solução fisiológica na pata controle.

Após a mensuração do edema de pata, os animais foram sacrificados por sobredose anestésica – quetamina e xilazina. Em seguida, foi realizada a retirada da

pata posterior direita (teste) e esquerda (controle) na altura da articulação tibiotársica. As patas foram cortadas em pequenos pedaços e incubadas em solução aquosa de formamida (1/1, v/v) por 48 h a 56°C. Em triplicata, a densidade óptica do sobrenadante foi medida a 620 nm em um leitor de placas (Ultra microplate reader EL 808, Bio-Tek Instruments, INC, EUA).

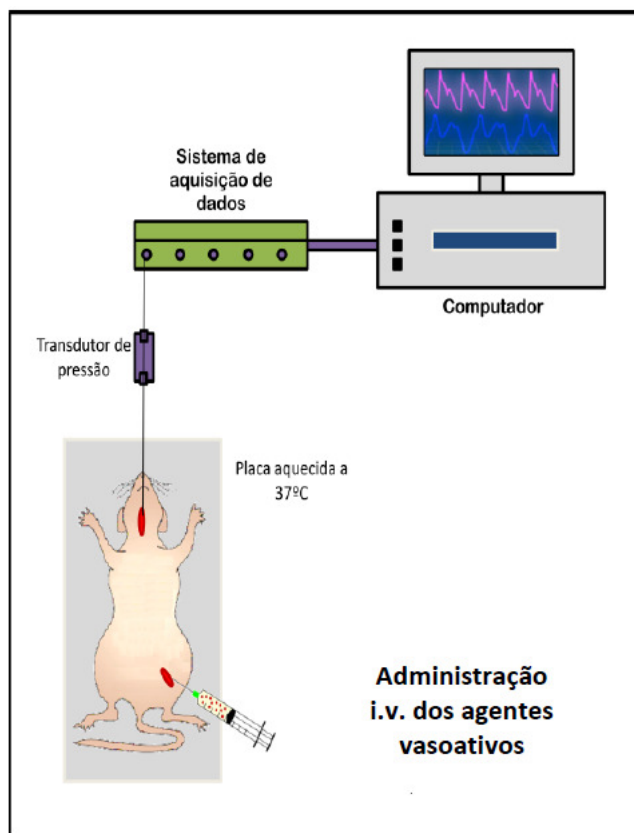
Por meio da confecção de uma curva de calibração do corante azul de Evans diluído em formamida, as concentrações de azul de Evans obtidas para cada amostra foram determinadas a partir da relação matemática entre concentração *versus* absorbância obtida pela fórmula de regressão linear. Os resultados foram expressos por meio da razão µg de azul de Evans/mg de tecido.

4.8 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

Os animais foram anestesiados com uma combinação de quetamina (75 mg/Kg) e de xilazina (15 mg/Kg), injetados por via intramuscular. Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida (35-36°C). A veia femoral foi localizada e nesse acesso venoso foi inserida uma agulha acoplada a uma cânula de polietileno (PE 50) e seringa. Esse acesso serviu para a administração dos compostos que foram utilizados no estudo. Na sequência, a artéria carótida esquerda foi localizada e, de forma cuidadosa e rápida, separada do nervo vago e tecidos adjacentes. Logo após esse procedimento, inseriu-se um cateter 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, Castle Hill, Austrália) (FIGURA 12).

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 BK e DABK foi avaliada através da injeção subsequente de doses crescentes (3, 10, 30 ou 100 nmol/Kg) de cada composto antes e após a administração do antagonista B₁ DALBK. Ao final do experimento os animais foram sacrificados por sobredose anestésica – quetamina e xilazina.

FIGURA 12 – Representação do preparo do animal para a avaliação dos parâmetros cardiovasculares e administração dos agentes vasoativos



Fonte: MENDES, R.T. *Efeitos cardiovasculares da inibição da ciclooxygenase 2 em um modelo experimental de periodontite induzida por ligadura*. 2012, 85f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2012.

4.9 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS E TECIDUAIS DE TNF- α e IL-1 β

A fim de caracterizar a inflamação sistêmica induzida pelo processo periodontal e sua correlação com a indução da expressão dos receptores B₁ para cininas, os níveis plasmáticos e do tecido da pata das citocinas TNF- α e IL-1 β foram quantificados. Os animais (grupo falso-operado e ligadura) foram sacrificados por sobredose anestésica sendo coletado o conteúdo sanguíneo e o tecido da pata. A mensuração plasmática e tecidual do TNF- α e da IL-1 β foram realizadas por meio da metodologia de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), sendo utilizado o kit Quantikine® ELISA Rat IL-1 β /IL-1F2 (R&D Systems, INC, Minneapolis, EUA) para a quantificação da IL-1 β e o kit Peprotech® para a quantificação do TNF- α .

4.10 WESTERN-BLOTTING PARA O RECEPTOR B₁ PARA CININAS

4.10.1 Preparo das amostras

Os animais foram sacrificados por sobredose anestésica sendo coletados o tecido vascular da aorta torácica, o tecido gengival e o tecido da pata. Imediatamente, estes tecidos foram homogeneizados (T10 Basic Ultra Turrax, IKA Works, INC, USA) em tampão RIPA. O homogenato resultante foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante armazenado em -80°C. A concentração de proteínas presentes nos tecidos foi determinada por meio da metodologia de Bradford (BRADFORD, M. M., 1976). Neste procedimento, 1 µL da amostra foi colocada em contato com 200 µL do reagente de Bradford sendo a intensidade da absorbância da mistura determinada em 595 nm.

4.10.2 Eletroforese em gel de sulfato dodecil de sódio (SDS)/Poliacrilamida

Alíquotas de 70 µg de proteínas extraídas dos tecidos em análise foram adicionadas ao tampão de amostra (Tris-HCl 200 mM, pH 6,8, glicerol 50%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 2,75 mM e azul de bromofenol 0,04%). Em seguida, as amostras foram aquecidas em banho seco, a 100°C, por 4 min. As amostras assim preparadas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% sob uma tensão de 15 V (Sistema Mini VE, GE Healthcare, Reino Unido).

4.10.3 Transferência e revelação

Após a realização da eletroforese em gel de poliacrilamida 10% em presença de SDS, foi realizada a transferência eletroforética (30 mA, 60 minutos) (Sistema Mini VE, GE Healthcare, Reino Unido) das proteínas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose. A membrana contendo as proteínas transferidas foi incubada com solução bloqueadora 5% de leite desnatado em tampão Tris 200 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, contendo 0,1% de detergente Tween 20, durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, realizou-se a incubação *overnight* a 4°C, com o anticorpo policlonal (produzido em coelho) anti-B₁ (1:250) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, EUA) sob agitação orbital fraca. Após a incubação com o

anticorpo primário, a membrana foi lavada com tampão fosfato de sódio (PBS) – Tween 20 e incubada com o anticorpo secundário (1:1000) anti-coelho marcado com estreptovidina-peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Inc, EUA) por 2 horas sob agitação orbital fraca. A reação foi detectada por autorradiografia quimioluminescente, utilizando como substrato para a enzima estreptovidina-peroxidase uma solução contendo H_2O_2 e luminol. Após 5 minutos de incubação da membrana com o agente quimioluminescente, as bandas foram reveladas a partir do auxílio de um filme fotográfico.

4.11 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.11.1 Protocolo 1 - Variáveis inflamatórias: Avaliação inflamatória do edema de pata induzido por carragenina, BK, serotonina, histamina e PGE_2

Um total de 40 animais foram submetidos ao procedimento de colocação de ligadura, 40 animais foram incluídos no grupo falso-operado e 3 animais formaram o grupo naive. Após 14 dias da colocação das ligaduras ou da falsa cirurgia (item 4.3) cada um destes grupos foi novamente randomizado para formar os grupos abaixo:

Grupo 1A: Grupo ligadura + Injeção intraplantar de carragenina (n=8)

Grupo 1B: Grupo falso-operado + Injeção intraplantar de carragenina (n=8)

Grupo 1C: Grupo naive + Injeção intraplantar de carragenina (n=3)

Grupo 2A: Grupo ligadura + Injeção intraplantar de BK (n=8)

Grupo 2B: Grupo falso-operado + Injeção intraplantar de BK (n=8)

GRUPO 3A: Grupo ligadura + Injeção intraplantar de serotonina (n=8)

GRUPO 3B: Grupo falso-operado + Injeção intraplantar de serotonina (n=8)

GRUPO 4A: Grupo ligadura + Injeção intraplantar de histamina (n=8)

GRUPO 4B: Grupo falso-operado + Injeção intraplantar de histamina (n=8)

GRUPO 5A: Grupo ligadura + Injeção intraplantar de PGE_2 (n=8)

GRUPO 5B: Grupo falso-operado + Injeção intraplantar de PGE_2 (n=8)

Após a injeção intraplantar de cada uma destas substâncias foi realizado o procedimento de edema de pata (item 4.5). Ao término da realização do procedimento os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica, sendo retirada mandíbula e maxila para a avaliação da perda óssea alveolar (item 4.4).

4.11.2 Protocolo 2 – Variáveis inflamatórias: Avaliação do antagonismo B₁ (DALBK) no edema de pata induzido pelo agonista DABK

Um total de 16 animais foram submetidos ao procedimento de colocação de ligaduras e 8 animais foram inseridos no grupo falso-operado. Após 14 dias da colocação das ligaduras ou da falsa cirurgia (item 4.3) cada um destes grupos foi novamente randomizado para formar os grupos abaixo:

Grupo 1A: Grupo ligadura + Injeção intraplantar de DABK (n=8)

Grupo 1B: Grupo ligadura + Injeção intraplantar de DABK e DALBK (n=8)

Grupo 1C: Grupo falso-operado + Injeção intraplantar de DABK (n=8)

Após 14 dias da colocação das ligaduras ou da falsa cirurgia os animais foram submetidos a avaliação do edema de pata (item 4.5), sendo que a injeção intraplantar na pata teste no grupo 3B consistiu em uma mistura de 20 µL de solução fisiológica contendo DABK (30 nmol/pata) e 30 µL de solução fisiológica contendo DALBK (200 nmol/pata).

4.11.3 Protocolo 3 - Inflamação: Avaliação da migração de neutrófilos por meio da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase

Um total de 32 animais foram submetidos ao procedimento de colocação de ligadura ou a falsa cirurgia, conforme descrito acima (item 4.3) e 3 animais formaram o grupo naíve. Após 14 dias da colocação das ligaduras ou da falsa cirurgia cada um destes grupos foi novamente randomizado para formar os grupos abaixo:

Grupo 1A: Grupo ligadura + Avaliação da migração de neutrófilos (MPO) após 2 horas da injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) (n=8)

Grupo 1B: Grupo falso-operado + Avaliação da migração de neutrófilos (MPO) após 2 horas da injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) (n=8)

Grupo 2A: Grupo ligadura + Avaliação da migração de neutrófilos (MPO) após 4 horas da injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) (n=8)

Grupo 2B: Grupo falso-operado + Avaliação da migração de neutrófilos (MPO) após 4 horas da injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) (n=8)

Após 2 horas (grupo 1) e 4 horas (grupo 2) da injeção de intraplantar de 50 µL de carragenina (pata teste) e de 50 µL de solução fisiológica (pata controle), os animais foram eutanasiados e o tecido de ambas as patas foi coletado. Nestes tecidos, a avaliação da migração de neutrófilos foi realizada por meio da quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (item 4.6).

4.11.4 Protocolo 4 - Inflamação: Avaliação do extravasamento plasmático – permeabilidade vascular para o agente edematogênico carragenina

Um total de 16 animais foram submetidos ao procedimento de colocação de ligadura ou a falsa cirurgia, conforme descrito acima (item 4.3). Após 14 dias da colocação das ligaduras ou da falsa cirurgia cada um destes grupos foi novamente randomizado para formar os grupos abaixo:

Grupo 1A: Grupo ligadura + Avaliação da permeabilidade vascular após 4 horas da injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) (n=8)

Grupo 1B: Grupo falso-operado + Avaliação da permeabilidade vascular após 4 horas da injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) (n=8)

Após 4 horas (grupo 2) da injeção de intraplantar de 50 µL de carragenina (pata teste) e de 50 µL de solução fisiológica (pata controle), os animais foram eutanasiados e o tecido de ambas as patas foi coletado. Nestes tecidos, a avaliação da permeabilidade vascular foi realizada por meio da quantificação da atividade do extravasamento plasmático (item 4.7).

4.11.5 Protocolo 5 - Inflamação: Avaliação do estado inflamatório sistêmico induzido pela periodontite

Um total de 24 animais foram submetidos ao procedimento de colocação de ligaduras e 24 animais foram incluídos no grupo falso-operado, 2 animais foram incluídos no grupo controle positivo. Após a colocação das ligaduras ou falsa cirurgia (item 4.3) cada um destes grupos foi novamente randomizado para formar o grupo abaixo:

Grupo 1A: Grupo ligadura submetido à quantificação plasmática e tecidual de TNF- α e IL-1 β após 3 dias da indução da periodontite (n=8)

Grupo 1B: Grupo falso-operado submetido à quantificação plasmática e tecidual de TNF- α e IL-1 β após 3 dias da indução da periodontite (n=8)

Grupo 2A: Grupo ligadura submetido à quantificação plasmática e tecidual de TNF- α e IL-1 β após 7 dias da indução da periodontite (n=8)

Grupo 2B: Grupo falso-operado submetido à quantificação plasmática e tecidual de TNF- α e IL-1 β após 7 dias da indução da periodontite (n=8)

Grupo 3A: Grupo ligadura submetido à quantificação plasmática e tecidual de TNF- α e IL-1 β após 14 dias da indução da periodontite (n=8)

Grupo 3B: Grupo falso-operado submetido à quantificação plasmática e tecidual de TNF- α e IL-1 β após 14 dias da indução da periodontite (n=8)

Após 3 dias (grupo 1), 7 dias (grupo 2) e 14 dias (grupo 3) da colocação das ligaduras ou da falsa cirurgia os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica sendo retirado o conteúdo sanguíneo por meio da canulação da artéria carótida e o tecido da pata. Como controle positivo do teste, foi aplicado LPS de *E. coli* (1 mg/Kg) 24 h antes da coleta do sangue nos animais do grupo controle. Em seguida, foi realizada a quantificação das citocinas IL-1 β para o plasma e para o tecido da pata (item 4.9).

4.11.6 Protocolo 6 – Variáveis cardiovasculares: Avaliação da resposta de agonistas dos receptores B₁ e B_{2q}

Um total de 16 animais foram submetidos ao procedimento de colocação de ligadura (n=8) ou a falsa cirurgia (n=8) (item 4.3). Após 14 dias da colocação das ligaduras ou da falsa cirurgia os animais foram submetidos a avaliação da pressão arterial (item 4.8). Brevemente, para cada animal foi avaliado tanto a reatividade vascular para BK nas doses crescentes de (1, 30, 100 nmol/Kg) e DABK nas doses crescentes de (10, 30, 100 nmol/Kg) antes e após a administração do antagonista B₁ DALBK na dose de 100 nmol/Kg. Após o término da realização dos procedimentos os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica.

4.11.7 Protocolo 7: Western-blotting para o receptor B₁ para cininas

Um total de 16 animais foram submetidos ao procedimento de colocação de ligadura ou a falsa cirurgia, conforme descrito acima (item 4.3). Após 14 dias da colocação das ligaduras ou da falsa cirurgia cada um destes grupos foi novamente randomizado para formar os grupos abaixo:

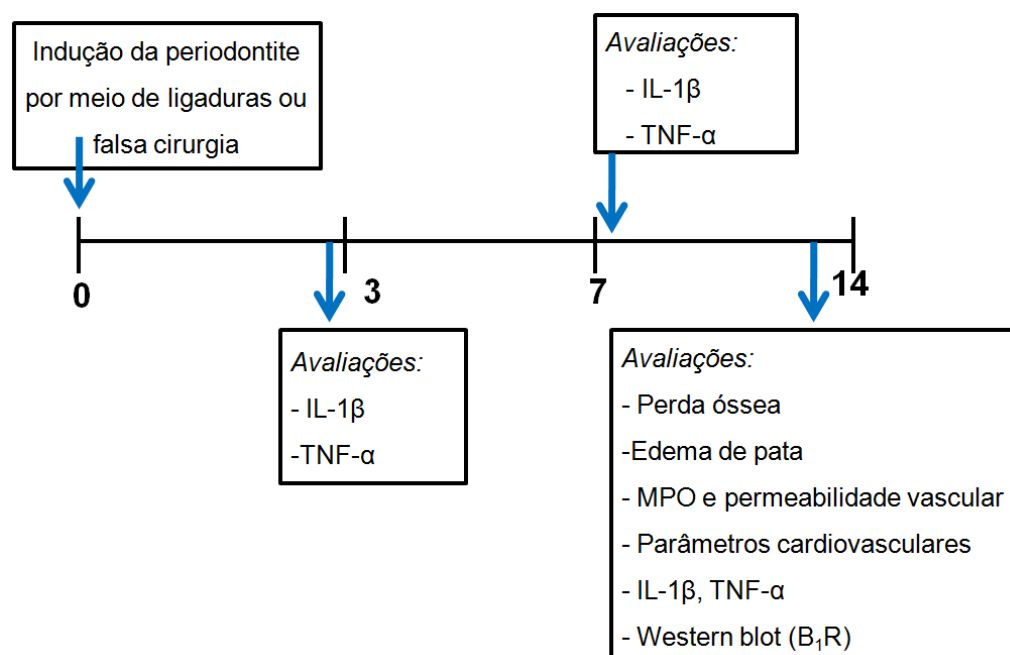
Grupo 1A: Grupo ligadura + western-blotting para o receptor B₁ para cininas (n=8)

Grupo 1B: Grupo falso-operado + western-blotting para o receptor B₁ para cininas (n=8)

Após 14 dias da indução da periodontite os animais foram eutanasiados e o tecido da pata foi coletado. Nestes tecidos, a quantificação protéica para o receptor B₁ para cininas foi realizada por meio da metodologia de western-blotting (item 4.10).

Os protocolos experimentais realizados no presente trabalho se resumem na figura a seguir (FIGURA 13).

FIGURA 13 – Resumo esquemático dos protocolos experimentais



Fonte: A autora.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M.). A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias) seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. O nível de significância aceito para os testes foi de $\alpha = 0,05$ (5%). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPadPrism versão 5.01, San Diego, Califórnia, EUA.

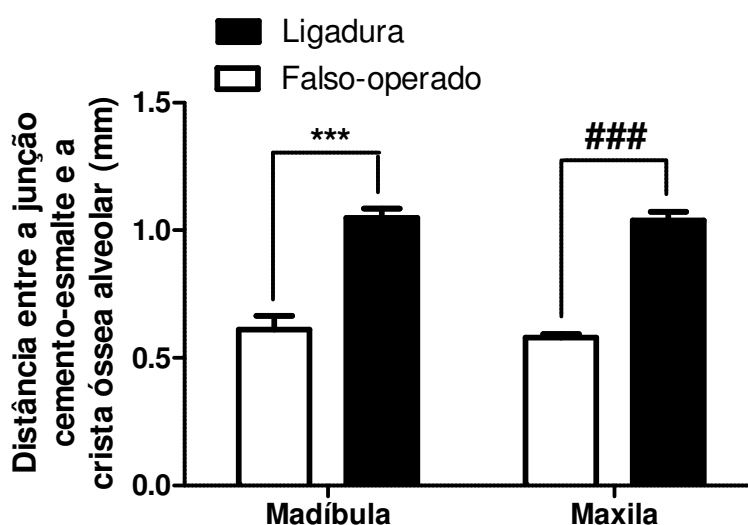
RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 PERDA ÓSSEA ALVEOLAR MÉDIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE – CARACTERIZAÇÃO DA INSTALAÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL

A fim de confirmar a instalação da doença periodontal por meio do modelo experimental de colocação de ligaduras entre os primeiros molares inferiores e segundos molares superiores direito e esquerdo, realizou-se o experimento descrito nos itens 4.3 e 4.4. Como pode ser observado (FIGURA 14), houve perda óssea alveolar estatisticamente significativa ($p < 0,001$) tanto na mandíbula como na maxila do grupo ligadura em relação ao grupo falso-operado.

FIGURA 14 – Avaliação da perda óssea alveolar média (mm) induzida pelo modelo experimental de periodontite

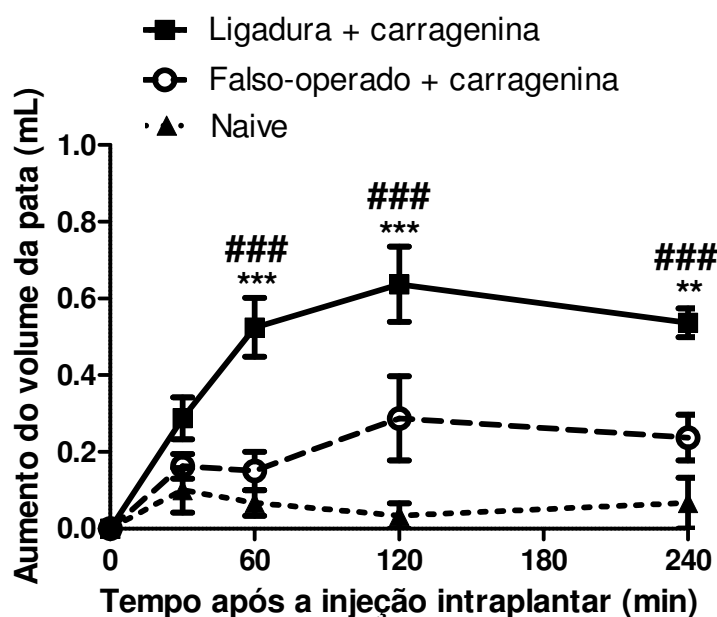


Nota: As barras representam a média e a linha acima o erro padrão da média, $n = 8$. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (* $p < 0,001$ em relação ao grupo falso-operado para mandíbula e # $p < 0,001$ em relação ao grupo falso-operado para maxila).

5.2 AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA – CARACTERIZAÇÃO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA INDUZIDA PELA PERIODONTITE

Conforme o item 4.11.1, a realização do experimento de edema de pata com a utilização da carragenina, um agente edematogênico inespecífico, permitiu a avaliação do quadro inflamatório sistêmico entre os grupos experimentais. Diferença estatística significativa foi obtida respectivamente nos tempos de 60 min ($p < 0,001$), 120 min ($p < 0,001$) e 240 min ($p < 0,01$) onde o edema de pata nos animais falso-operado foi respectivamente $71 \pm 5\%$, $55 \pm 10\%$ e $56 \pm 5\%$ menor do que o edema de pata nos animais do grupo ligadura (FIGURA 15). Para os animais do grupo naive o edema de pata foi respectivamente $87 \pm 3\%$, $95 \pm 3\%$ e $88 \pm 4\%$ menor do que o edema de pata do grupo ligadura para os tempos de 60 min ($p < 0,001$), 120 min ($p < 0,001$) e 240 min ($p < 0,001$). Nenhuma diferença significativa foi obtida na análise estatística entre o grupo falso-operado e o grupo naive.

FIGURA 15 – Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite por meio do edema de pata mediado por carragenina (100 μg /pata)

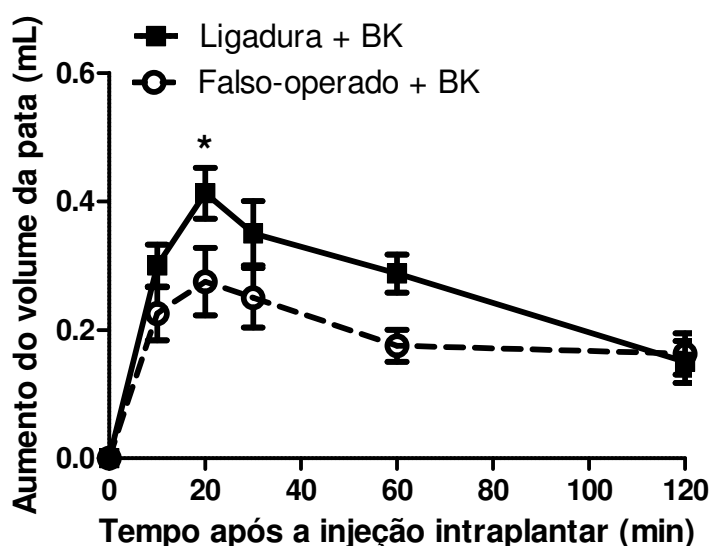


Nota: Os pontos representam a média e a linha acima o erro padrão da média, $n = 8$ e $n = 3$ para o grupo naive. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo falso-operado e ### $p < 0,001$ em relação ao grupo naive).

5.3 AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR BRADICININA – CARACTERIZAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR B_2 NA INDUÇÃO DO EDEMA DE PATA

A participação dos receptores B₂ para cininas no edema de pata induzido pela BK foi realizada conforme o item 4.11.1. Os valores obtidos para o edema de pata induzido pela BK nos intervalos de 10, 20, 30, 60 e 120 min foram respectivamente $0,30 \pm 0,03$ mL, $0,41 \pm 0,04$ mL; $0,35 \pm 0,05$ mL; $0,29 \pm 0,03$ mL e $0,15 \pm 0,03$ mL para os animais do grupo ligadura e $0,22 \pm 0,04$ mL; $0,27 \pm 0,04$ mL; $0,25 \pm 0,05$ mL; $0,18 \pm 0,02$ mL e $0,16 \pm 0,03$ mL para os animais do grupo falso-operado (FIGURA 16). Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais foi observada no tempo de 20 min.

FIGURA 16 – Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite por meio do edema de pata mediado por BK (3 nmol/pata)



Nota: Os pontos representam a média e a linha acima o erro padrão da média, $n = 8$. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo falso-operado).

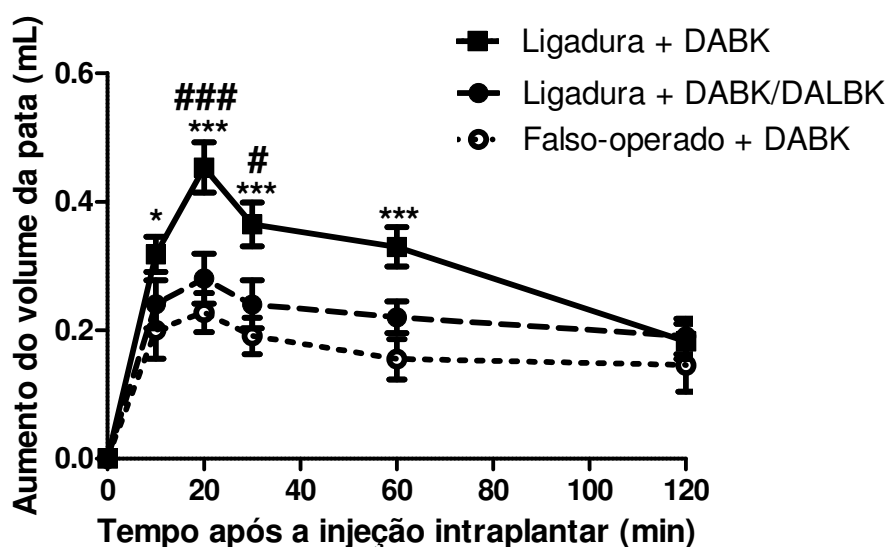
5.4 AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR DES-ARG⁹-BRADICININA – CARACTERIZAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR B₁ NA INDUÇÃO DO EDEMA DE PATA

A participação dos receptores B₁ para cininas no edema de pata induzido por DABK foi realizada conforme o item 4.11.2. Os valores obtidos para o edema de pata induzido por DABK nos intervalos de 10, 20, 30, 60 e 120 min foram respectivamente $0,32 \pm 0,03$ mL; $0,45 \pm 0,04$ mL; $0,36 \pm 0,03$ mL; $0,33 \pm 0,03$ mL e

0,19 $\pm$ 0,03 mL para os animais do grupo ligadura e 0,20 $\pm$ 0,04 mL; 0,23 $\pm$ 0,03 mL; 0,19 $\pm$ 0,03 mL; 0,15 $\pm$ 0,03 mL e 0,14 $\pm$ 0,04 mL para os animais do grupo falso-operado (FIGURA 17). Diferença estatística significativa entre o grupo ligadura e falso-operado foram observadas nos tempos de 10 min ($p < 0,05$), 20 min ($p < 0,001$), 30 min ($p < 0,001$) e 60 min ($p < 0,001$).

Os valores obtidos para o edema induzido pela solução DABK/DALBK nos intervalos de 10, 20, 30, 60 e 120 min foram respectivamente 0,24 $\pm$ 0,03 mL; 0,28 $\pm$ 0,04 mL; 0,24 $\pm$ 0,03 mL; 0,22 $\pm$ 0,02 mL e 0,19 $\pm$ 0,03 mL. Diferença estatística significativa entre o grupo ligadura + DABK e o grupo ligadura + DABK/DALBK foram observadas nos tempos de 20 min ($p < 0,001$) e 30 min ($p < 0,05$), correspondendo respectivamente a uma redução de 38,18% e 34,19% do edema induzido por DABK.

FIGURA 17 – Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite a partir do edema de pata mediado por DABK (30 nmol/pata)



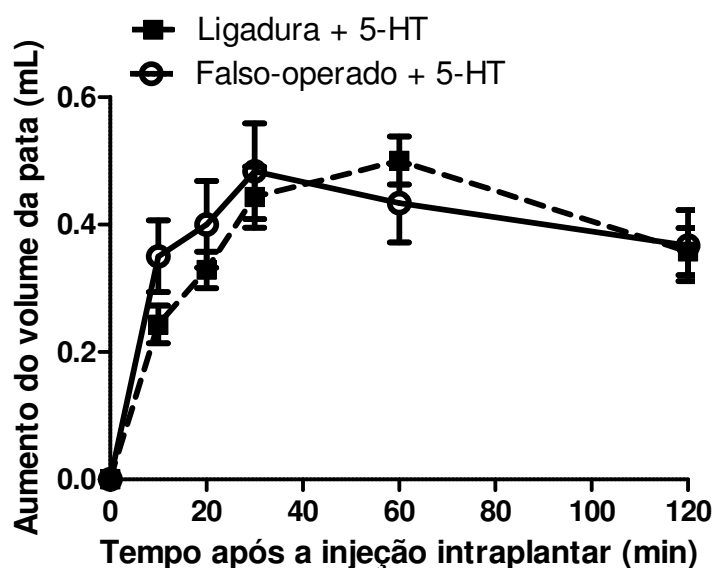
Nota: Os pontos representam a média e a linha acima o erro padrão da média, $n = 8$. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ em relação ao grupo falso-operado; # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ em relação ao grupo ligadura + DABK/DALBK).

5.5 AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DE AGENTES EDEMATOGÊNICOS NÃO RELACIONADOS AO SISTEMA DE CININAS NO QUADRO INFLAMATÓRIO SISTÊMICO INDUZIDO PELA PERIODONTITE

5.5.1 Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite a partir do edema de pata mediado por serotonina (5-HT)

A participação da serotonina na reação edematogênica entre os grupos ligadura e falso-operado foi realizada conforme o item 4.11.1. Os valores obtidos para o edema de pata induzido por serotonina nos intervalos de 10, 20, 30, 60 e 120 min foram respectivamente $0,24 \pm 0,03$ mL, $0,32 \pm 0,03$ mL; $0,44 \pm 0,05$ mL; $0,50 \pm 0,04$ mL e $0,35 \pm 0,04$ mL para os animais do grupo ligadura e $0,35 \pm 0,06$ mL; $0,40 \pm 0,07$ mL; $0,48 \pm 0,07$ mL; $0,43 \pm 0,06$ mL e $0,37 \pm 0,05$ mL para os animais do grupo falso-operado (FIGURA 18). Nos cinco tempos avaliados nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos experimentais foi observada para o aumento do volume da pata (mL).

FIGURA 18 – Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite a partir do edema de pata mediado por serotonina (5 nmol/pata)



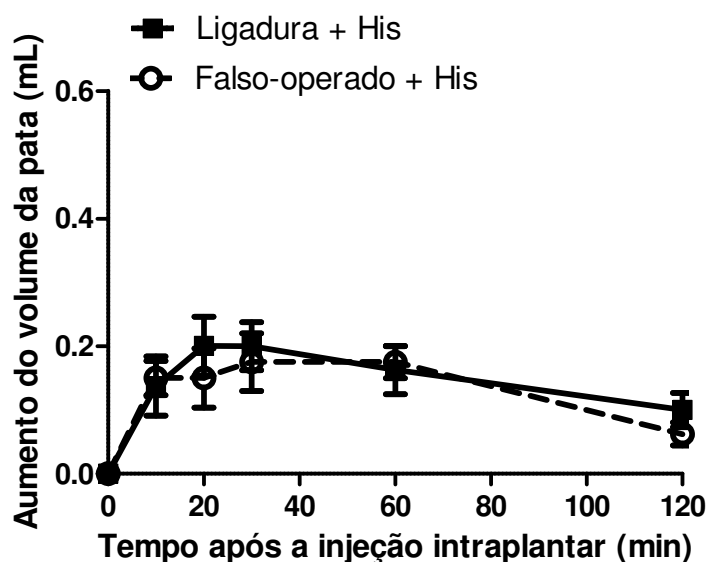
Nota: Os pontos representam a média e a linha acima o erro padrão da média, $n = 8$. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni.

5.5.2 Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite a partir do edema de pata mediado por histamina (His)

A participação da histamina na reação edematogênica entre os grupos ligadura e falso-operado foi realizada conforme o item 4.11.1. Os valores obtidos

para o edema de pata induzido por histamina nos intervalos de 10, 20, 30, 60 e 120 min foram respectivamente $0,14 \pm 0,05$ mL, $0,20 \pm 0,05$ mL; $0,20 \pm 0,04$ mL; $0,16 \pm 0,04$ mL e $0,10 \pm 0,03$ mL para os animais do grupo ligadura e $0,15 \pm 0,03$ mL; $0,15 \pm 0,05$ mL; $0,18 \pm 0,04$ mL; $0,18 \pm 0,02$ mL e $0,06 \pm 0,02$ mL para os animais do grupo falso-operado (FIGURA 19). Nos cinco tempos avaliados nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos experimentais foi observada para o aumento do volume da pata (mL).

FIGURA 19 – Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite a partir do edema de pata mediado por histamina (10 nmol/pata)



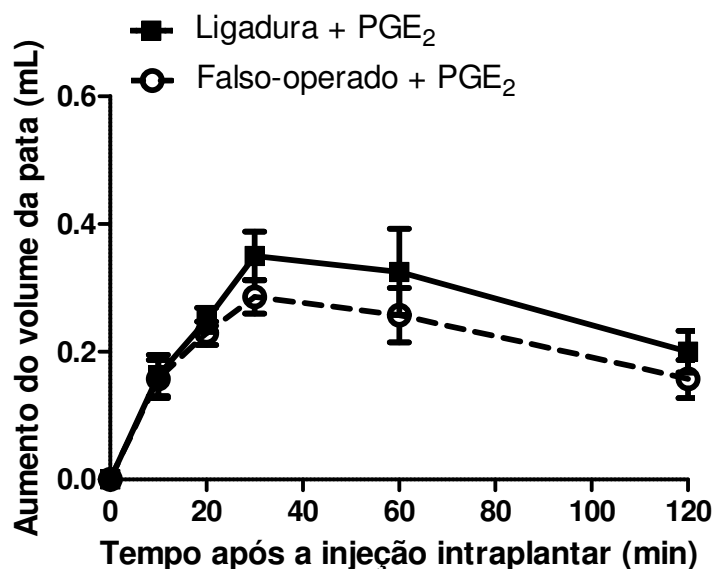
Nota: Os pontos representam a média e a linha acima o erro padrão da média, $n = 8$. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni.

5.5.3 Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite a partir do edema de pata mediado por PGE_2

A participação da PGE_2 na reação edematogênica entre os grupos ligadura e falso-operado foi realizada conforme o item 4.11.1. Os valores obtidos para o edema de pata induzido por PGE_2 nos intervalos de 10, 20, 30, 60 e 120 min foram respectivamente $0,16 \pm 0,03$ mL, $0,25 \pm 0,02$ mL; $0,35 \pm 0,04$ mL; $0,32 \pm 0,07$ mL e $0,20 \pm 0,03$ mL para os animais do grupo ligadura e $0,16 \pm 0,03$ mL; $0,23 \pm 0,02$ mL; $0,29 \pm 0,03$ mL; $0,26 \pm 0,04$ mL e $0,16 \pm 0,03$ mL para os animais do grupo falso-operado (FIGURA 20). Nos cinco tempos avaliados nenhuma diferença estatística

significativa entre os grupos experimentais foi observada para o aumento do volume da pata (mL).

FIGURA 20 – Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite a partir do edema de pata mediado por prostaglandina E_2 (1 nmol/pata)

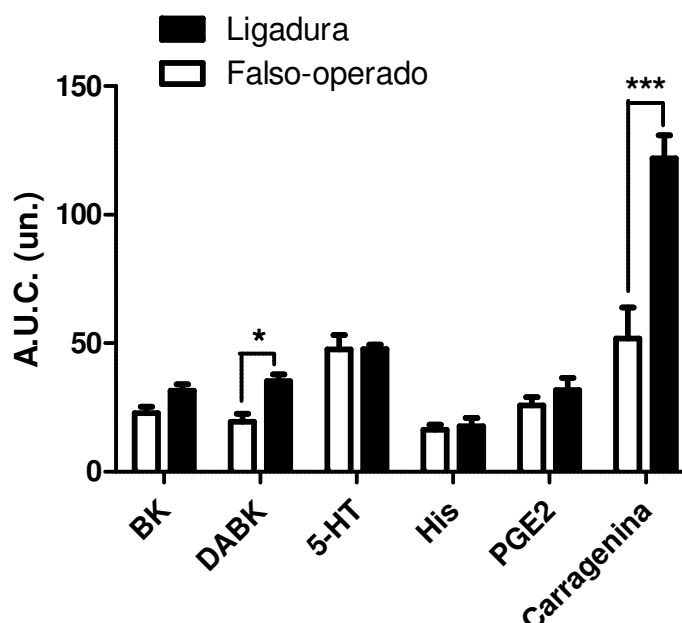


Nota: Os pontos representam a média e a linha acima o erro padrão da média, $n = 8$. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni.

5.6 COMPARATIVO DA CONTRIBUIÇÃO DOS AGENTES EDEMATOGÊNICOS RELACIONADOS E NÃO RELACIONADOS AO SISTEMA DE CININAS NO QUADRO INFLAMATÓRIO SISTÊMICO INDUZIDO PELA PERIODONTITE

A comparação dos diferentes agentes edematogênicos analisados a partir da determinação da área sobre a curva (A.U.C.) demonstrou que a carragenina e o mediador derivado do sistema de cininas, DABK, foram os principais agentes edematogênicos relacionados a alterações significativas entre os grupos experimentais ligadura e falso-operado (FIGURA 21).

FIGURA 21 – Avaliação da inflamação sistêmica induzida pela periodontite a partir da análise da A.U.C. do edema de pata mediado por BK (3 nmol/pata), DABK (30 nmol/pata), 5-HT (5 nmol/pata), His (10 nmol/pata), PGE₂ (1 nmol/pata) e carragenina (100 µg/pata)

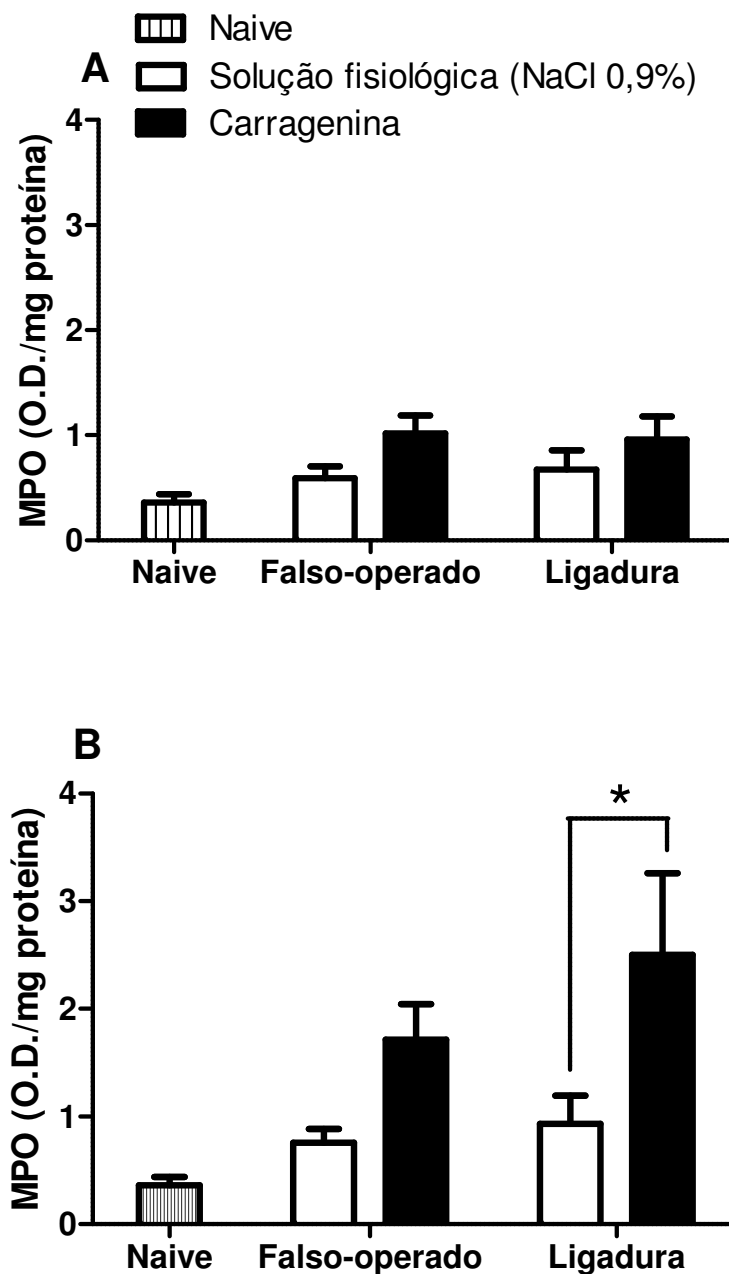


Nota: As barras representam a média e a linha acima o erro padrão da média, n = 8. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ em relação ao grupo falso-operado).

5.7 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS POR MEIO DA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE

A contribuição da migração de neutrófilos no edema de pata induzido por carragenina foi avaliada conforme o item 4.11.3. No tempo de 2 h após a injeção intraplantar de carragenina, nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos experimentais e o grupo naive foi observada (FIGURA 22, PAINEL A). Para o tempo de 4 h após a injeção intraplantar de carragenina observou-se, para o grupo falso-operado, um aumento na atividade da enzima MPO de 2,28 vezes em relação a pata solução fisiológica e a pata carragenina. Para o grupo ligadura, observou-se um aumento na atividade da enzima MPO de 2,67 vezes em relação a pata solução fisiológica e a pata carragenina, sendo observado uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as patas carragenina e solução fisiológica para este grupo experimental (FIGURA 22, PAINEL B).

FIGURA 22 – Avaliação da migração de neutrófilos por meio da determinação da atividade da enzima mieloperoxidase

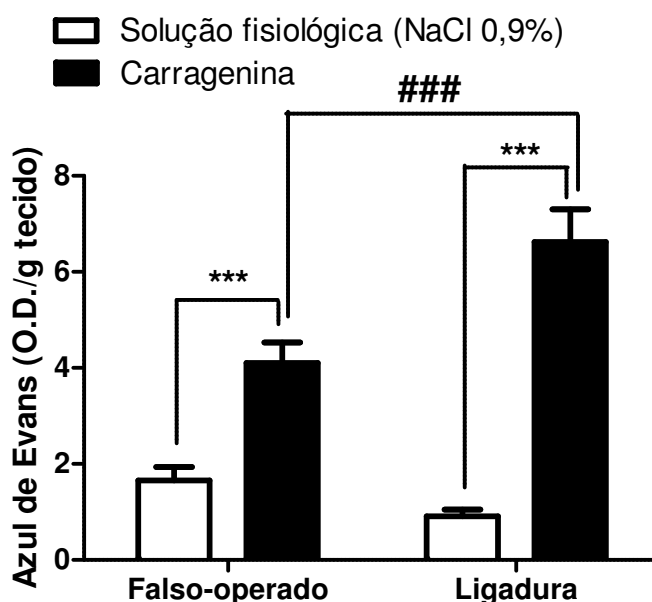


Nota: Atividade da enzima MPO (O.D./mg de proteína) após (A) 2 h e (B) 4 h da injeção intraplantar de carragenina. As barras representam a média e a linha acima o erro padrão da média, n = 8. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (* p < 0,05 em relação ao grupo pata salina).

5.8 AVALIAÇÃO DO EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO – PERMEABILIDADE VASCULAR PARA O AGENTE EDEMATOGÊNICO CARRAGENINA

A contribuição do aumento da permeabilidade vascular no edema de pata induzido por carragenina foi avaliada conforme o item 4.11.4. No tempo de 4 h após a injeção intraplantar de carragenina observou-se, para o grupo falso-operado, um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$) de 2,47 vezes no extravasamento do corante azul de Evans entre a pata carragenina e a pata solução fisiológica. Para o grupo ligadura, observou-se um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$) de 7,29 vezes no extravasamento do corante azul de Evans entre a pata carragenina e a pata solução fisiológica. Além disso, foi observado um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$) de 1,61 vezes no extravasamento do corante azul de Evans entre as patas submetidas a injeção intraplantar de carragenina para os grupos ligadura e falso-operado (FIGURA 23).

FIGURA 23 – Avaliação da permeabilidade vascular a partir do extravasamento do corante azul de Evans

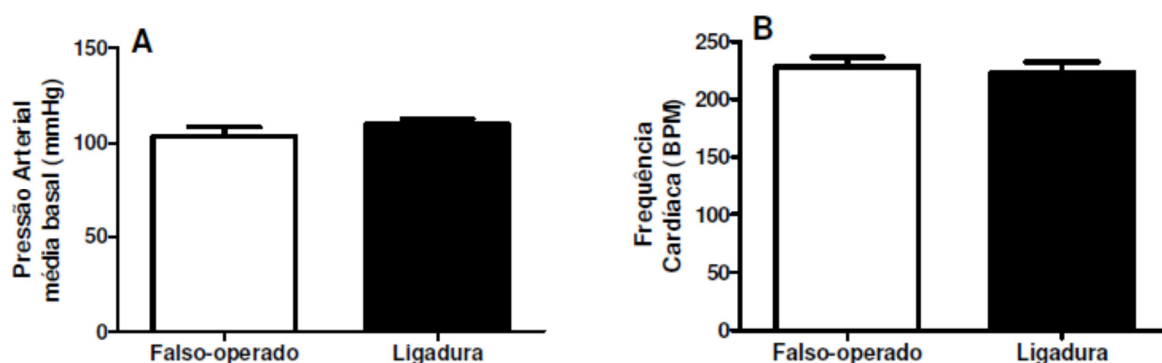


Nota: Extravasamento plasmático do corante azul de Evans (O.D./ g tecido) após 4h da injeção intraplantar de carragenina. As barras representam a média e a linha acima o erro padrão da média, $n = 8$. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (***) $p < 0,001$ em relação ao grupo pata salina e ### $p < 0,001$ em relação falso-operado).

5.9 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES INDUZIDOS PELA REATIVIDADE VASCULAR AOS COMPONENTES DO SISTEMA DE CININAS FRENTE AO ESTADO INFLAMATÓRIO CRÔNICO INDUZIDO PELA PERIODONTITE

Após a avaliação da participação dos receptores B₁ e B₂ para cininas em nível de inflamação sistêmica (edema de pata), realizou-se a investigação da participação dos mesmos receptores na reatividade vascular endotelial conforme o item 4.11.6. Primeiramente, foram comparados os níveis de pressão arterial média basal (FIGURA 24, PAINEL A) e frequência cardíaca (FIGURA 24, PAINEL B) entre os grupos ligadura e falso-operado. Na avaliação destes parâmetros nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos experimentais foi encontrada.

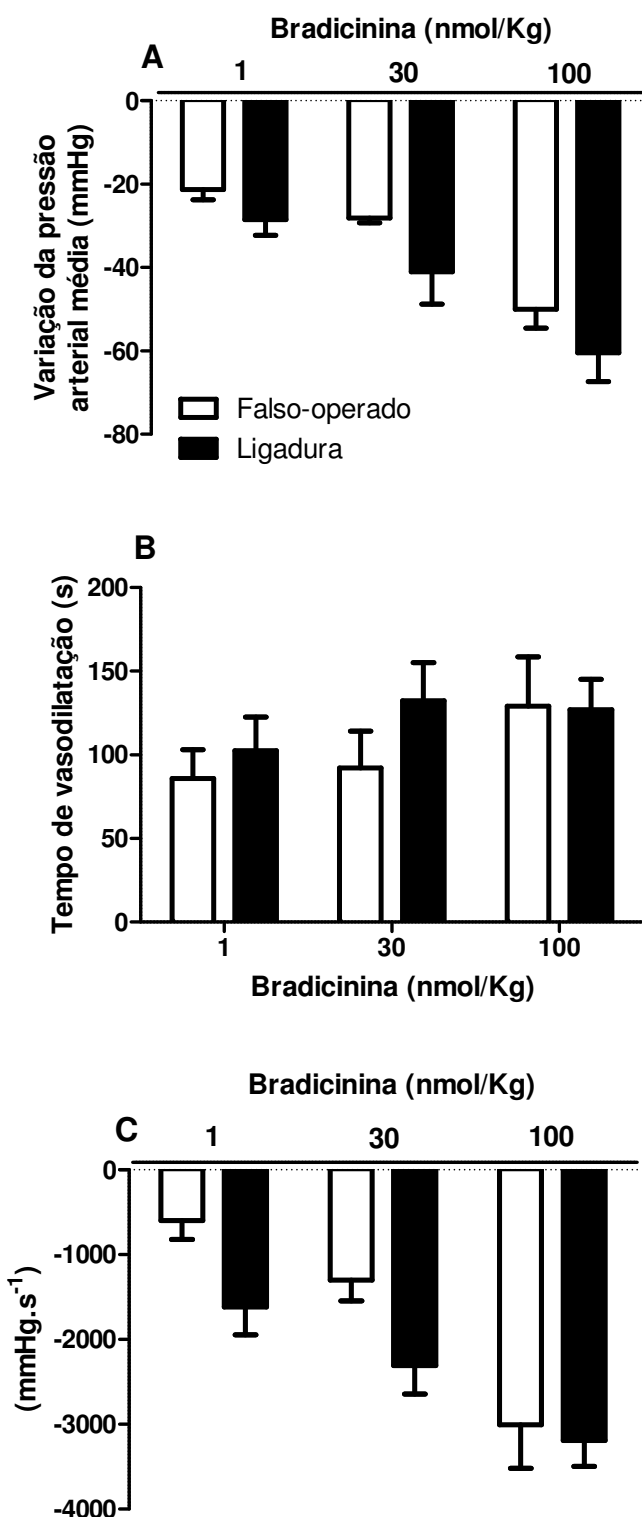
FIGURA 24 – Avaliação de parâmetros cardiovasculares (pressão arterial média basal e frequência cardíaca) em modelo experimental de periodontite



Nota: (A) Pressão arterial média basal (mmHg) e (B) Frequência cardíaca (BPM). As barras representam a média e a linha acima o erro padrão da média, $n = 8$. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni.

A investigação específica da participação dos receptores B₂ para cininas na função endotelial entre os grupos experimentais ligadura e falso-operado foi comparada a partir da ação vasodilatadora promovida pela BK. Nas três doses de BK avaliadas, foi observado um padrão dose-resposta, mas nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos experimentais foi observada na variação da pressão arterial média (FIGURA 25, PAINEL A), no tempo de vasodilatação (FIGURA 25, PAINEL B) e na relação pressão arterial versus tempo de vasodilatação (FIGURA 25, PAINEL C).

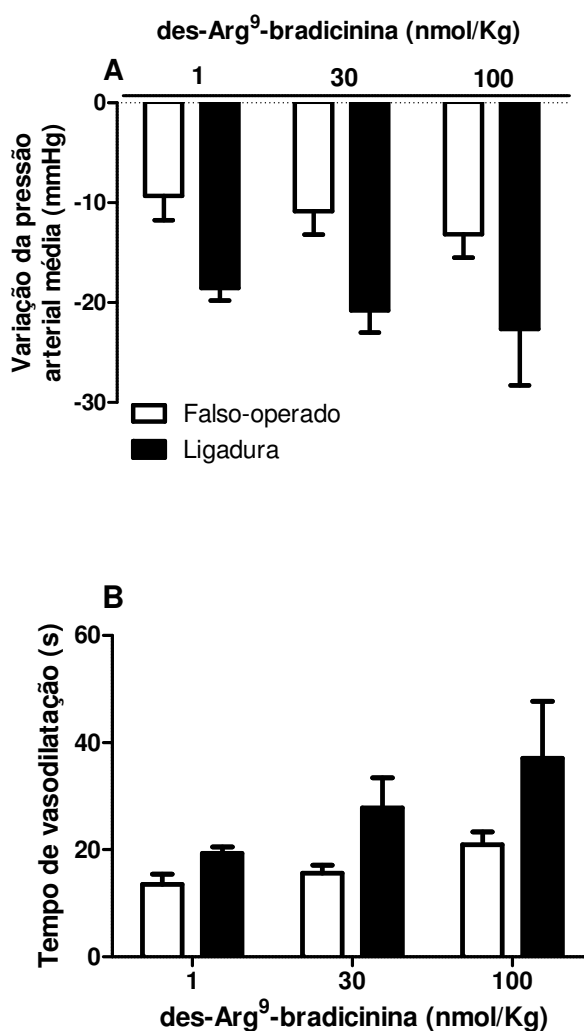
FIGURA 25 – Avaliação de parâmetros cardiovasculares induzidos pela reatividade vascular do receptor B₂ para cininas

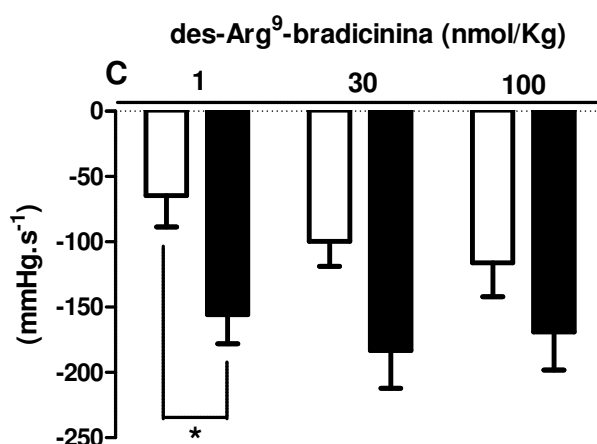


Nota: (A) Variação na pressão arterial média (mmHg), (B) Tempo de vasodilatação e (C) Relação pressão arterial versus tempo de vasodilatação (mmHg.s⁻¹), após a administração i.v. de doses crescentes (nmol/Kg) do agonista B₂BK. As barras representam a média e a linha acima o erro padrão da média, n = 8. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni.

A investigação específica da participação dos receptores B_1 na função endotelial entre os grupos experimentais ligadura e falso-operado foi comparada a partir da ação vasodilatadora promovida pelo agonista B_1 DABK. Nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos experimentais foi observada na variação da pressão arterial média (FIGURA 26, PAINEL A) e no tempo de vasodilatação (FIGURA 26, PAINEL B). Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foi observada na avaliação da relação pressão arterial versus tempo de vasodilatação para a concentração de 1 nmol/Kg de DABK (FIGURA 26, PAINEL C).

FIGURA 26 – Avaliação de parâmetros cardiovasculares induzidos pela reatividade vascular do receptor B_1 para cininas

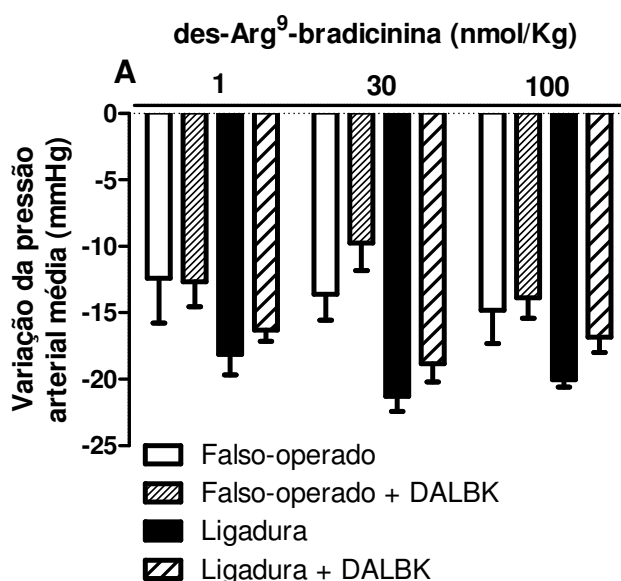


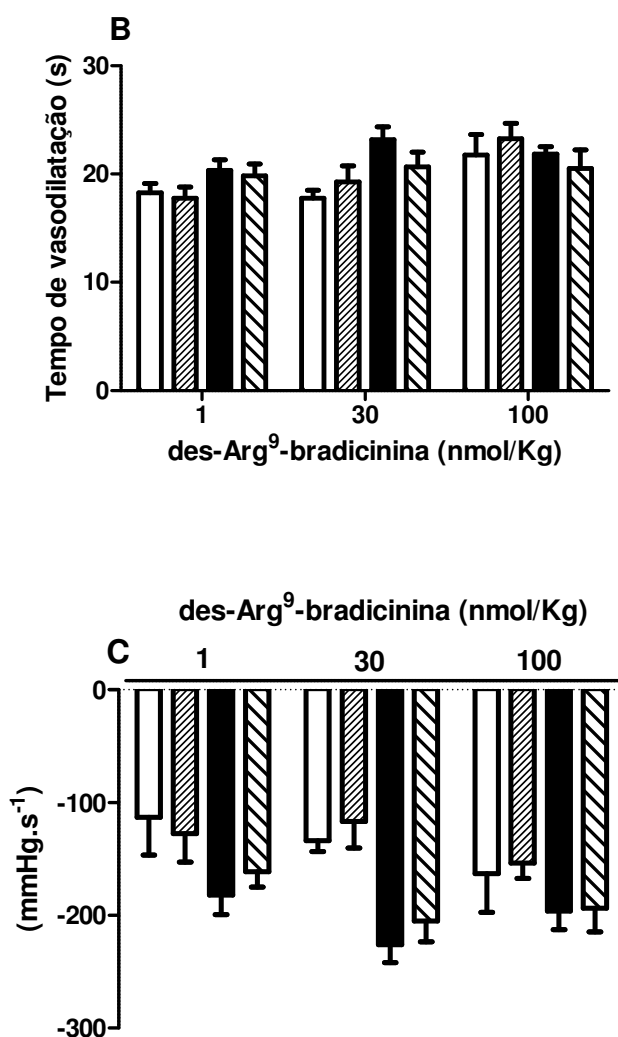


Nota: (A) Variação na pressão arterial média (mmHg), (B) Tempo de vasodilatação e (C) Relação pressão arterial versus tempo de vasodilatação (mmHg.s⁻¹), após a administração i.v. de doses crescentes (nmol/Kg) do agonista B₁BK. As barras representam a média e a linha acima o erro padrão da média, n = 8. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (* p < 0,05 em relação ao grupo falso-operado).

A fim de avaliar se os efeitos na variação da pressão arterial média e no tempo de vasodilatação obtidos na figura 26 foram específicos ao receptor B₁, realizou-se o bloqueio deste receptor a partir do uso do antagonista DALBK (FIGURA 27).

FIGURA 27 – Avaliação de parâmetros cardiovasculares induzidos pela reatividade vascular do receptor B₁ para cininas





Nota: (A) Variação na pressão arterial média (mmHg), (B) Tempo de vasodilatação (s) e (C) Relação pressão arterial versus tempo de vasodilatação (mmHg.s⁻¹), após a administração i.v. de doses crescentes (nmol/Kg) do agonista B₁BK. As barras representam a média e a linha acima o erro padrão da média, n = 8. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni.

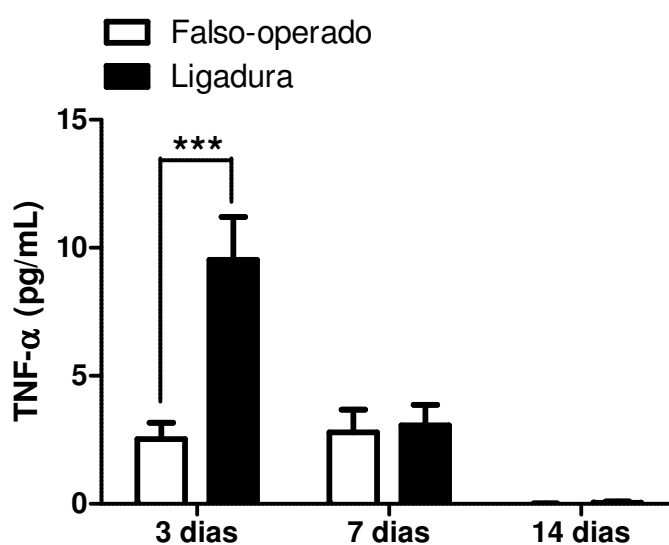
Após o bloqueio do receptor B₁ com o uso do antagonista DALBK nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos experimentais foi observada na variação da pressão arterial média (FIGURA 27, PAINEL A), no tempo de vasodilatação (FIGURA 27, PAINEL B) e na relação pressão arterial versus tempo de vasodilatação (FIGURA 27, PAINEL C). Esse resultado indica que os efeitos vasoativos obtidos a partir da utilização do agonista B₁ DABK não foram específicos ao receptor B₁ para cininas.

5.10 AVALIAÇÃO DO ESTADO INFLAMATÓRIO SISTÊMICO INDUZIDO PELA PERIODONTITE – QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS E TECIDUAIS DE TNF- α e IL-1 β

5.10.1 Quantificação dos níveis plasmáticos e teciduais de TNF- α

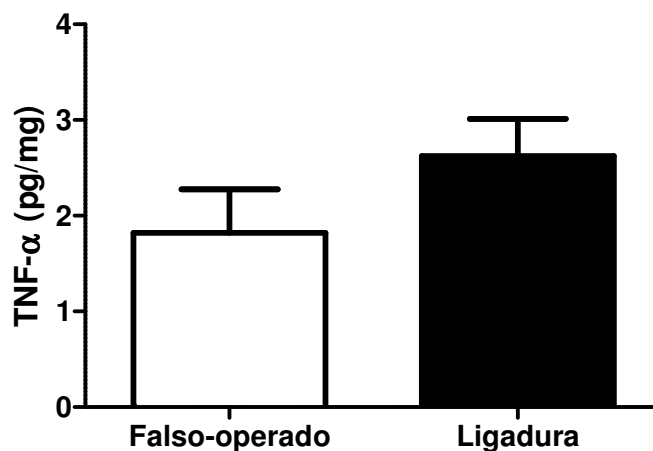
A avaliação dos níveis plasmáticos de TNF- α após 3, 7 e 14 dias da indução da periodontite demonstrou um aumento estatisticamente significativo nos níveis plasmáticos de TNF- α entre os grupos experimentais no tempo de 3 dias ($p < 0,001$) (FIGURA 28).

FIGURA 28 – Avaliação dos níveis plasmáticos de TNF- α após 3, 7 e 14 dias da indução da periodontite



Nota: Concentração plasmática de TNF- α (pg/mL) após 3, 7 e 14 dias da indução da periodontite. As barras representam a média e a linha acima o erro padrão da média, $n = 8$. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni.

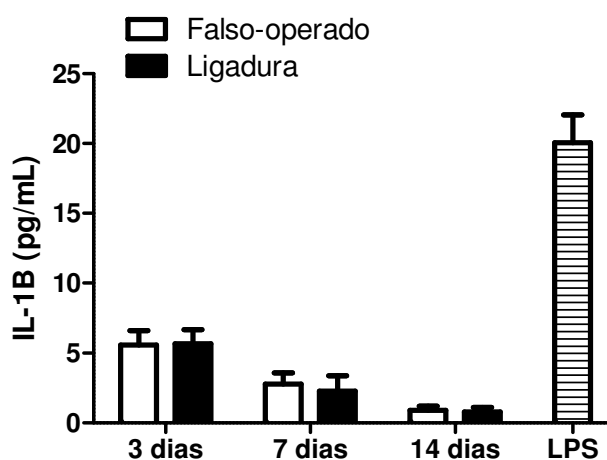
Em contrapartida ao resultado dos níveis plasmáticos de TNF- α , a avaliação dos níveis teciduais (pata) desta citocina 14 dias após a indução da periodontite não demonstrou nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos ligadura e o falso-operado (FIGURA 29).

FIGURA 29 – Avaliação dos níveis teciduais de TNF- α após 14 dias da indução da periodontite

Nota: Concentração tecidual (pata) de TNF- α (pg/mg de proteína) após 14 dias da indução da periodontite. As barras representam a média e a linha acima o erro padrão da média, $n = 8$. A análise estatística foi realizada por teste t não-pareado.

5.10.2 Quantificação dos níveis plasmáticos e teciduais de IL-1 β

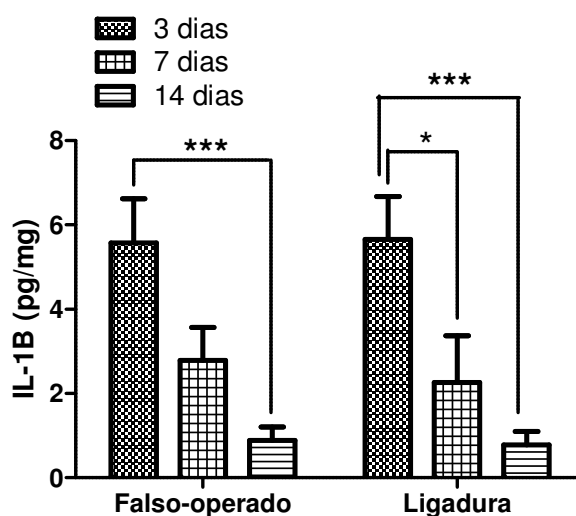
A avaliação dos níveis plasmáticos de IL-1 β após 3, 7 e 14 dias da indução da periodontite não demonstrou nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos ligadura e o falso-operado nos diferentes tempos avaliados (FIGURA 30).

FIGURA 30 – Avaliação dos níveis plasmáticos de IL-1 β após 3, 7 e 14 dias da indução da periodontite

Nota: Concentração plasmática de IL-1 β (pg/mL) após 3, 7 e 14 dias da indução da periodontite. As barras representam a média e a linha acima o erro padrão da média, $n = 8$. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni.

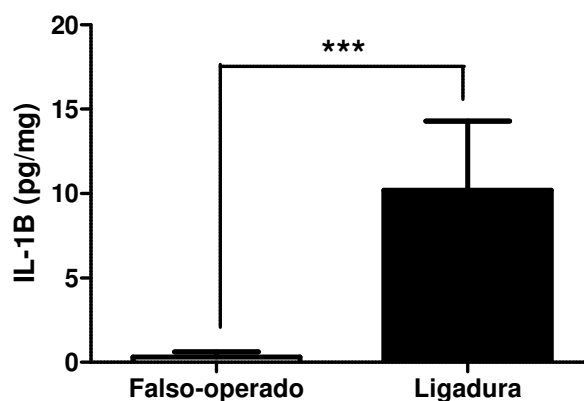
Apesar da não observação de alterações nos níveis plasmáticos de IL-1 β entre os grupos experimentais foi observado uma redução gradual e estatisticamente significativa nos níveis plasmáticos desta interleucina entre os tempos experimentais de 3 e 14 dias ($p < 0,001$) para o grupo falso-operado e 3, 7 ($p < 0,05$) e 14 dias ($p < 0,001$) para o grupo ligadura (FIGURA 31).

FIGURA 31 – Avaliação temporal dos níveis plasmáticos de IL-1 β após 3, 7 e 14 dias da indução da periodontite



Nota: Concentração plasmática de IL-1 β (pg/mL) após 3, 7 e 14 dias da indução da periodontite. As barras representam a média e a linha acima o erro padrão da média, $n = 8$. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao tempo de 3 dias).

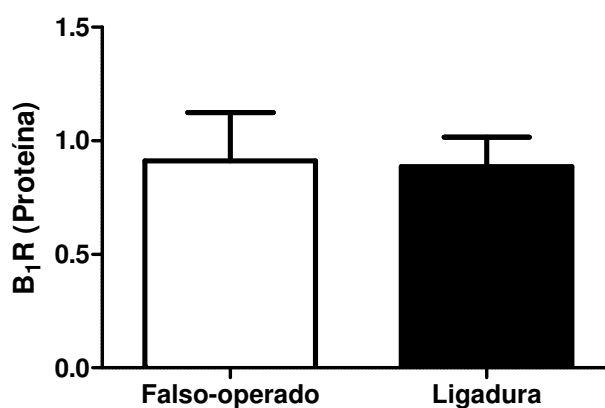
Em contrapartida ao resultado dos níveis plasmáticos de IL-1 β , os níveis teciduais (pata) de IL-1 β após 14 dias da indução da periodontite demonstraram um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,001$) entre o grupo ligadura e o grupo falso-operado (FIGURA 32).

FIGURA 32 – Avaliação dos níveis teciduais de IL-1 β após 14 dias da indução da periodontite

Nota: Concentração tecidual (pata) de IL-1 β (pg/mg de proteína) após 14 dias da indução da periodontite. As barras representam a média e a linha acima o erro padrão da média, n = 8. A análise estatística foi realizada por teste t não-pareado. (***) p < 0,001 em relação ao grupo falso-operado).

5.11 AVALIAÇÃO DO ESTADO INFLAMATÓRIO SISTÊMICO INDUZIDO PELA PERIODONTITE – QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS TECIDUAIS DO RECEPTOR B₁ PARA CININAS

A quantificação protéica do receptor B₁ para cininas no tecido da pata dos animais submetidos a 14 dias de indução da periodontite não demonstrou nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos ligadura e o falso-operado (FIGURA 33).

FIGURA 33 – Quantificação protéica do receptor B₁ para cininas no tecido da pata

Nota: Quantificação protéica do receptor B₁ para cininas no tecido da pata após 14 dias da indução da periodontite. As barras representam a média e a linha acima o erro padrão da média, n = 8. A análise estatística foi realizada por teste t não-pareado.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 CONTRIBUIÇÃO DO SISTEMA DE CININAS NAS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS INDUZIDAS PELA PERIODONTITE

A periodontite é uma doença inflamatória crônica que compromete os tecidos de suporte do elemento dentário. Esta patologia afeta atualmente cerca de 750 milhões de pessoas ao redor do mundo (KASSEBAUM et al., 2014). Além da relevância epidemiológica, pesquisas emergentes interligam a periodontite a um variado número de patologias sistêmicas (OTOMO-CORGEL et al., 2012).

O mecanismo biológico de correlação entre periodontite e alterações sistêmicas é evidenciado pela capacidade dos microrganismos orais, produtos metabólicos e mediadores inflamatórios produzidos localmente pela infecção/inflamação periodontal acessarem regiões distantes do foco oral e nesses locais promoverem alterações fisiopatológicas sistêmicas (HAJISHENGALLIS, 2015). Para a comprovação desta relação biológica entre periodontite e alterações sistêmicas é necessário a realização de estudos clínicos e a utilização de modelos animais.

A utilização de modelos animais tem sido importante na compreensão da fisiopatologia da periodontite e das alterações sistêmicas induzidas por esta patologia. O modelo de doença periodontal em ratos é uma alternativa válida e promissora (STRUILLOU et al., 2010) que consiste no método mais utilizado para a compreensão do início e progressão da periodontite (KIMURA et al., 2000). Alternativas para a indução da periodontite em modelos experimentais são a colocação de ligaduras e ou a inoculação de periodontopatógenos (OZ; PULEO, 2011).

No presente trabalho optou-se pelo modelo de indução da periodontite por meio da colocação de ligaduras de algodão em ratos *Wistar* machos. Esse modelo já consagrado na literatura (HOLZHAUSEN et al., 2002), comprovadamente induz uma inflamação que se assemelha a periodontite humana. A colocação das ligaduras ao redor dos dentes do animal, a nível cervical e possivelmente na região subgengival, objetiva o acúmulo de biofilme na região com o conseqüente desenvolvimento da patologia periodontal (HAJISHENGALLIS; LAMONT; GRAVES, 2015).

A maioria dos trabalhos com modelos de indução da periodontite através de ligaduras reporta a utilização de uma (AZOUBEL et al., 2007) ou duas ligaduras (SOUZA et al., 2010), visto que a finalidade desses estudos consistiu na avaliação dos efeitos locais da periodontite. Todavia, para o presente estudo optou-se pela colocação de quatro ligaduras visto que o objetivo do trabalho consistiu na avaliação das alterações sistêmicas promovidas pela periodontite.

Embora a inflamação e infecção local com conseqüente perda óssea já iniciem nos primeiros dias após a colocação das ligaduras em ratos (HERRERA et al., 2011), as alterações sistêmicas são mais marcantes a partir do sétimo dia, com um pico de ocorrência em torno da segunda semana de indução (BRITO et al., 2013). Herrera et al. (2011), demonstraram que a partir de 7 dias da colocação das ligaduras já se observava significativa perda óssea alveolar, porém esta alteração se tornava mais marcante a partir do décimo quarto dia. Sabendo destes fatores, no presente trabalho, optou-se pela realização da maioria dos procedimentos experimentais após 14 dias da indução da doença periodontal.

Em conformidade com os estudos prévios do modelo de indução da periodontite a partir da colocação de ligaduras, o presente estudo demonstrou que este modelo foi efetivo em induzir perda óssea alveolar (FIGURA 14), simulando desta forma, uma das principais características da periodontite humana.

Além dos impactos locais, a doença periodontal exibe uma associação com múltiplas condições sistêmicas (OTOMO-CORGEL et al., 2012). Apesar do mecanismo de correlação entre periodontite e doenças sistêmicas não estar totalmente elucidado, diversos estudos propõem que os periodontopatógenos possam acessar a circulação sistêmica ocasionando a invasão do endotélio vascular e o aumento dos níveis plasmáticos de mediadores inflamatórios (HOKAMURA et al., 2010; MONTEIRO et al., 2009). Dessa maneira, pacientes com periodontite crônica podem apresentar um aumento no risco de desenvolvimento de condições fisiopatológicas complexas como diabetes, doenças cardiovasculares, osteoporose, artrite reumatóide e doenças respiratórias (DETERT et al., 2010).

Ao avaliar os estudos disponíveis sobre a conexão entre doença periodontal e marcadores inflamatórios sistêmicos, Gomes et al. (2013) a partir de uma meta-análise, observaram que a periodontite, em humanos, associa-se ao aumento dos níveis plasmáticos de PCR, IL-1, IL-2, IL-6, imunoglobulinas A, G, M e TNF- α . Esses achados descritos na literatura científica sugerem que a periodontite contribui para

uma resposta inflamatória sistêmica não confinada ao local da lesão periodontal, o que potencialmente correlaciona a doença periodontal com diferentes patologias de natureza inflamatória e cardiovascular (PALM et al., 2013).

Baseando-se na correlação entre periodontite e inflamação sistêmica o presente trabalho investigou, a partir da metodologia de edema de pata, o estado inflamatório sistêmico e a participação dos receptores B₁ e B₂ para cininas na inflamação sistêmica promovida pela doença periodontal.

O modelo experimental de indução de edema de pata estabeleceu-se na literatura científica como uma ferramenta de investigação pré-clínica de fármacos antiinflamatórios (SAKAT et al., 2013). Diferentes substâncias edematogênicas podem ser utilizadas para a indução de respostas inflamatórias tais como carragenina e sulfato de dextrana. Em geral, a mensuração quantitativa do edema de pata pode ser realizada a partir da medição do diâmetro dorsoventral da pata submetida ao teste como também a partir da mensuração da diferença de volume entre as patas teste e controle, utilizando-se nesta metodologia o equipamento denominado plestimômetro (BHAFT; MEHTA; SHRIVASTAVA, 1977; MURAYAMA et al., 1991).

O uso da carragenina, um polissacarídeo sulfatado derivado da alga *Chondrus Crispus*, para a indução de edema de pata foi inicialmente introduzido por Winter et al. (1962). Este agente promove a formação de edema por meio de um processo irritante e proteolítico que promove a liberação e formação subsequente de vários mediadores inflamatórios (DI ROSA; SORRENTINO, 1968). A inflamação aguda induzida pela carragenina caracteriza-se como um evento bifásico (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971; DI ROSA; WILLOUGHBY, 1971). Na primeira fase (0 – 1 hora), histamina, serotonina, bradicinina e substância P são os principais mediadores inflamatórios liberados, sendo seguidos pela liberação de prostaglandinas e infiltração de células polimorfonucleadas que induzem, no sítio inflamatório, a secreção de outros mediadores tais como o óxido nítrico, prostaglandinas e citocinas (GILLIGAN et al., 1994).

No presente estudo, a avaliação do edema de pata induzido pela carragenina teve como objetivo a comparação do quadro inflamatório sistêmico entre os grupos falso-operado e ligadura. Optou-se pela utilização da metodologia de mensuração a partir do uso de pletismômetro. A dose de carragenina utilizada encontra-se dentro da faixa prevista pela literatura científica (0,1 a 1,0%), optando-se pelo limite inferior

para melhor avaliação de um possível aumento na resposta inflamatória (SHEJAWAL; MENON; SHAILAJAN, 2013).

Os resultados obtidos para o edema de pata induzido pela carragenina demonstraram que o grupo ligadura apresentou uma resposta inflamatória significativamente superior aos grupos experimentais falso-operado e controle em ambas as fases inflamatórias do edema (FIGURA 15). Este resultado demonstrou o potencial inflamatório sistêmico da periodontite (NAKAJIMA et al., 2010), indicando a capacidade do processo periodontal em promover alterações na resposta edematogênica em um tecido distante da cavidade oral.

A observação experimental do edema de pata mediado por carragenina demonstra que o aumento do edema no grupo ligadura em relação ao grupo falso-operado inicia-se após a primeira hora da inoculação da carragenina e perdura até as 4h do período de análise (FIGURA 15). Sabendo-se disso, surge a indagação biológica da possibilidade de que alterações nos mediadores inflamatórios específicos em cada fase do edema de pata induzido por carragenina possam estar alteradas em decorrência da inflamação sistêmica induzida pela periodontite.

Para determinar uma possível alteração induzida pela periodontite nos mediadores inflamatórios relacionados à primeira hora do edema de pata induzido pela carragenina (DI ROSA; SORRENTINO, 1968), foi realizada a avaliação do edema de pata induzido por serotonina e histamina após 14 dias da indução da periodontite. Nestes experimentos, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ligadura e falso-operado no edema de pata mediado por serotonina (FIGURA 18) e histamina (FIGURA 19).

A histamina sintetizada nos granulócitos basófilos, nas plaquetas e, principalmente nos mastócitos, provoca contrações das células endoteliais venulares, com conseqüente aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação (DE BENEDETTO et al., 2015). Já a serotonina encontrada nas plaquetas tem ação vasodilatadora e promove aumento da permeabilidade vascular (SHAJIB; KHAN, 2015). Dessa forma, o resultado obtido demonstra que as respostas inflamatórias e edematogênicas de ambas as substâncias, de seus receptores e vias de sinalização parecem não serem afetados pela inflamação sistêmica oriunda da periodontite.

A mediação inflamatória no período entre 1 e 2h após a inoculação da carragenina é caracterizada pela liberação de cininas (DI ROSA; SORRENTINO, 1968). Na situação patológica em questão a avaliação das cininas, em específico a

contribuição dos receptores B₁ e B₂ na ação edematogênica torna-se relevante visto a natureza induzível do receptor B₁ em situações inflamatórias crônicas como a periodontite (LEEB-LUNDBERG et al., 2001).

O envolvimento dos receptores B₁ e B₂ no edema de pata induzido por BK já é conhecido (CAMPOS; SOUZA; CALIXTO, 1998), como também a natureza constitutiva dos receptores B₂ em processos inflamatórios agudos e crônicos. Para tanto, no presente estudo, a avaliação da atividade do receptor B₂ no edema de pata induzido por BK teve como objetivo caracterizar a atividade fisiopatológica deste sistema receptor B₂/BK no processo inflamatório crônico induzido pela periodontite e verificar que a atividade deste receptor não foi diferenciada entre os grupos experimentais (FIGURA 16).

Corroborando com o resultado obtido para o edema de pata induzido pela BK, Hinode et al. (1992) demonstrou que diversas proteases isoladas do microrganismo *P. gingivalis*, apresentam *in vitro*, uma potente atividade cininogenase (SCOTT et al., 1993; SOJAR et al., 1993). Griesbacher et al. (1994) demonstraram que a injeção intraplantar em ratos *Sprague-Dawley* de extratos de *P. gingivalis*, ocasiona um aumento dose-dependente da permeabilidade vascular quantificada por meio do edema de pata. Onde, o uso do antagonista B₂, Icatibant, reduziu significativamente o edema promovido pelos extratos de *P. gingivalis*. Estes resultados demonstram que parte da resposta inflamatória presente no edema de pata no grupo ligadura ocorre devido a ativação tecidual dos receptores B₂ para cininas.

A correlação entre os receptores B₁ para cininas e a patologia periodontal foi primeiramente apresentada por Dornelles et al. (2009) que demonstraram que o LPS do microrganismo *P. gingivalis* promoveu um edema de pata induzido pelo agonista B₁ DABK. O presente estudo corrobora e amplia a relação entre periodontite e expressão dos receptores B₁ observadas por Dornelles et al. (2009). Sendo que, a observação do aumento significativo da atividade funcional do receptor B₁ no edema de pata induzido por DABK no grupo ligadura, indica que os receptores B₁ foram expressos em um local distante do foco periodontal. Esse resultado amplia as observações de Dornelles et al. (2009) que analisam especificamente a expressão dos receptores B₁ após a administração intraplantar do LPS do microrganismo *P. gingivalis*.

Tendo em vista o aumento da atividade funcional dos receptores B₁ para cininas no grupo ligadura, a pergunta proveniente desta observação experimental

foi: “Como a periodontite foi capaz de estimular os processos de sinalização celular relacionadas a indução dos receptores B₁?” A literatura científica demonstra a ocorrência de um rápido aumento do edema de pata causado pelos agonistas seletivos do receptor B₁ após tratamento agudo com citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β e TNF- α (ROCHA et al., 2005). Sendo que os efeitos da IL-1 β e do TNF- α na indução da expressão dos receptores B₁ correlacionam-se com a modulação da produção secundária de citocinas inflamatórias, pela ativação de diversas proteínas quinases, e a partir da ativação do fator NF- κ B (CAMPOS; SOUZA; CALIXTO, 1998; 1999).

Sabendo-se da correlação entre TNF- α e IL-1 β na indução da expressão dos receptores B₁ para cininas, realizou-se a quantificação dos níveis plasmáticos e teciduais de TNF- α e IL- β para determinar a participação destas citocinas no processo inflamatório sistêmico induzido pela periodontite e correlacionar o aumento dos níveis plasmáticos destas citocinas com a indução do receptor B₁ no tecido da pata.

O presente trabalho demonstrou um aumento significativo dos níveis plasmáticos de TNF- α entre os grupos ligadura e falso-operado após 3 dias da indução da periodontite (FIGURA 28). Em contrapartida os níveis plasmáticos de IL-1 β não variaram entre os grupos ligadura e falso-operado após 3, 7 e 14 dias da indução da periodontite (FIGURA 30). Apesar disso, observou-se uma redução gradual estatisticamente significativa dos níveis plasmáticos de IL-1 β entre os tempos experimentais de 3, 7 e 14 dias em ambos os grupos experimentais (FIGURA 31).

Na situação em estudo, evidencia-se a participação do TNF- α na modulação da resposta inflamatória sistêmica em resposta a periodontite. Evidências experimentais demonstram um aumento plasmático de IL-6 após 14 dias da colocação de ligaduras (MACHADO et al., 2013). Essa observação experimental é relevante visto que a IL-6 é produzida em resposta a microrganismos e em resposta ao aumento plasmático de TNF- α . (JIMENEZ-DALMARONI; GERSWHIN; ADAMOPOULOS, 2015). Pode-se então sugerir que, nos estágios iniciais da patogênese inflamatória sistêmica originária da doença periodontal o TNF- α , um importante indutor da expressão dos receptores B₁ para cininas, possa contribuir para a modulação da resposta imune inata ao insulto inflamatório sistêmico originário da periodontite.

O resultado da quantificação dos níveis plasmáticos de IL-1 β corrobora com as observações realizadas por Vardar-Segul et al. (2006) e Gurkan et al. (2009). Nestes estudos não foram observadas diferenças nos níveis plasmáticos de IL-1 β entre os grupos experimentais após 15 dias da indução da periodontite pelo modelo de administração gengival de LPS de *E.coli*. Ao avaliar o perfil de citocinas induzidas pelo processo inflamatório sistêmico após 8 dias da indução da periodontite pela metodologia de colocação de ligaduras, Kats et al. (2013) não observaram diferenças estatísticas significativas nos níveis plasmáticos de IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-13 e IL-18.

Os resultados obtidos para os níveis plasmáticos de TNF- α e IL-1 β após 3, 7 e 14 dias da indução da periodontite demonstram a necessidade de uma investigação detalhada sobre a indução plasmática tempo-dependente de diferentes citocinas em decorrência da inflamação sistêmica originária da periodontite. Visto que experimentos que avaliam as consequências inflamatórias sistêmicas da periodontite demonstram o aumento plasmático de IL-6 e PCR (PALM et al., 2013).

Em relação a quantificação local das citocinas TNF- α e IL-1 β , o presente estudo observou um aumento estatisticamente significativo nos níveis de IL-1 β no tecido da pata dos animais do grupo ligadura após 14 dias da indução da periodontite (FIGURA 32). Este resultado correlaciona-se com as observações de diferentes estudos experimentais que demonstram quantitativamente um aumento dos níveis de IL-1 β no tecido gengival no decorrer do desenvolvimento patogênico da periodontite (BRANCO-DE-ALMEIDA et al., 2012; ARAÚJO et al., 2013).

A observação do aumento nos níveis de IL-1 β no tecido da pata dos animais do grupo ligadura indica a possibilidade desta citocina contribuir diretamente para a indução da expressão dos receptores B₁ para cininas neste tecido. Esta hipótese torna-se plausível visto a observação farmacológica do aumento estatisticamente significativo no edema de pata mediado por DABK entre os grupos falso-operado e ligadura. Corroborando com a hipótese proposta, Dornelles et. al. (2009) observaram um aumento dos níveis de IL-1 β e um aumento da expressão do mRNA do receptor B₁ no tecido da pata em ratos *Wistar* após a administração intraplantar do LPS do microrganismo *P. gingivalis*.

Após a avaliação do edema mediado por cininas realizou-se a investigação do edema de pata induzido pela prostaglandina E₂ após 14 dias da colocação das

ligaduras. Essa avaliação foi relevante ao estudo em decorrência da observação experimental do edema de pata mediado pela carragenina (FIGURA 15). Onde, observou-se um aumento do edema no grupo ligadura em relação ao grupo falso-operado nos intervalos de tempo de 2 e 4h, onde a liberação local de PGE₂ torna-se importante na mediação do edema induzido pela carragenina.

A PGE₂ é um dos produtos da via metabólica do ácido araquidônico sendo sintetizada pela prostaglandina E₂ sintetase a partir da prostaglandina H₂ (PGH₂). Esta substância é um mediador lipídico que atua em conjunto aos receptores EP1, EP2, EP3 e EP4 (KAWAHARA et al., 2015). Em situações inflamatórias destaca-se a contribuição da PGE₂ no processo de vasodilatação e modulação da liberação local de citocinas (NORBERG et al., 2013).

No experimento de indução do edema de pata a partir da injeção intraplantar de PGE₂ não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo ligadura e falso-operado (FIGURA 20). Este resultado demonstra que a resposta edematogênica mediada pela PGE₂ não se diferencia entre os grupos experimentais, indicando que a contribuição inflamatória da PGE₂ não é alterada pela inflamação sistêmica oriunda da periodontite.

Sabendo-se da importância da migração de células polimorfonucleares e das alterações na permeabilidade vascular para o processo edematogênico, realizou-se a avaliação da migração de neutrófilos por meio da metodologia indireta de quantificação da atividade da enzima MPO após 2h e 4h da injeção intraplantar de carragenina. A avaliação da permeabilidade vascular foi realizada por meio da metodologia de extravasamento do corante azul de Evans após 4h da injeção intraplantar de carragenina.

A avaliação da migração de neutrófilos entre o grupo falso-operado e ligadura não demonstrou diferença estatística significativa entre as patas teste e controle para os grupos experimentais, 2h após da injeção intraplantar de carragenina (FIGURA 22, PAINEL A). Em contrapartida, observou-se um aumento na atividade da enzima MPO entre as patas teste e controle no grupo ligadura após 4h da inoculação deste agente edematogênico. Neste mesmo intervalo de análise nenhuma diferença foi observada entre as patas teste e controle no grupo falso-operado e no grupo naive (FIGURA 22, PAINEL B).

A análise da migração de neutrófilos após 4h da injeção intraplantar de carragenina indica que o aumento da atividade da enzima MPO no grupo ligadura

ocorre em decorrência do processo inflamatório sistêmico induzido pela periodontite visto que não foram observadas alterações na migração de neutrófilos entre os demais grupos experimentais. Esta observação corrobora com os estudos de Dornelles et al. (2009) que demonstraram um aumento da atividade da enzima MPO após a injeção intraplantar do LPS do microrganismo *P. gingivalis* em ratos *Wistar*.

A contribuição do aumento da permeabilidade vascular no edema de pata induzido por carragenina demonstrou a ocorrência de um aumento estatisticamente significativo no extravasamento do corante azul de Evans entre as patas submetidas a injeção intraplantar de carragenina para os grupos ligadura e falso-operado (FIGURA 23). Esse resultado corrobora com investigações *in vitro* e *in vivo* que evidenciam alterações na permeabilidade endotelial em decorrência do estímulo inflamatório promovido pelo LPS do microrganismo *P. gingivalis*. Dessa maneira, o estímulo inflamatório sistêmico induz a formação de junções GAP nas células endoteliais com consequente desestabilização da homeostasia endotelial (KIM et al., 2013).

Analizados em conjunto, os resultados experimentais indicam que a periodontite induz uma alteração inflamatória sistêmica, sendo que, os receptores B₁ para cininas parecem ser os principais mediadores inflamatórios relacionados a estas alterações inflamatórias. Essa hipótese se justifica pela ausência de diferenças entre os grupos experimentais nas respostas edematogênicas para os mediadores BK, serotonina, PGE₂ e histamina. Sendo necessário salientar que o presente estudo não realizou a avaliação de outros agentes inflamatórios, tais como o NO e substância P, que também podem estar relacionadas as alterações inflamatórias induzidas pela periodontite.

A observação do aumento da atividade funcional dos receptores B₁ no edema de pata induzido por DABK no grupo ligadura sugere que a periodontite é capaz de induzir as rotas de sinalização de indução do receptor B₁. Dentre essas rotas, destaca-se a capacidade dos periodontopatógenos ativar os receptores TLR2 e TLR4 (LIU et al., 2008). Sabendo que, a literatura científica demonstra que a ativação dos receptores TLR2 via LPS do microrganismo *P. gingivalis* leva a ativação da via TLR/JNK e a ativação dos receptores TLR4 leva a sinalização TLR4/NF-κB/p38MAPK (DARVEAU et al., 2004). Pode-se sugerir que essas duas vias de sinalização, somadas a ativação celular pelos mediadores inflamatórios TNF-α e IL-1β, podem ativar o fator NF-κB. (KIKKERT et al., 2007) Desta maneira, a

ativação do fator NF- κ B pode induzir a expressão protéica do receptor B₁ a partir da interação deste fator de transcrição com as regiões promotoras do gene correspondente ao receptor B₁.

O aumento da ativação dos receptores B₁ no edema de pata induzido por DABK no grupo ligadura indica que os receptores B₁ contribuem para as alterações na inflamação sistêmica induzidas pela periodontite a partir de suas propriedades de vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e aumento da migração de células polimorfonucleares (VIANNA; CALIXTO, 1998). No presente estudo, os efeitos diretos de vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e migração de células polimorfonucleares desencadeados pela ativação dos receptores B₁ não foram avaliados especificamente, sendo necessários estudos complementares para a caracterização da contribuição dessas atividades fisiopatológicas dos receptores B₁ nas alterações inflamatórias induzidas pela periodontite.

Destaca-se que o presente trabalho demonstrou um aumento da atividade funcional dos receptores B₁ para cininas na pata dos animais submetidos a periodontite. Para a confirmação da ocorrência da indução dos receptores B₁ no tecido da pata, realizou-se a quantificação protéica do receptor B₁ para cininas no tecido da pata dos animais submetidos a 14 dias de indução da periodontite. Nesse experimento não foi possível a observação de uma diferença na quantificação protéica do receptor B₁ entre os grupos ligadura e o falso-operado.

Mesmo com a ausência de comprovação do aumento dos níveis teciduais dos receptores B₁ no tecido da pata nos animais submetidos a periodontite, sugere-se quatro hipóteses para justificar esse resultado experimental (FIGURA 33). Primeiramente, a técnica de western-blotting possui uma limitação experimental em decorrência de realizar à quantificação do conteúdo global de proteínas do receptor B₁, não quantificando especificamente os receptores B₁ presentes na membrana celular. Em segundo lugar, destaca-se a dificuldade experimental observada na extração do material protéico da pata, podendo essa limitação ter interferido na quantificação final das proteínas do receptor B₁ para cininas.

A terceira justificativa para o resultado obtido no experimento de western-blotting consiste na hipótese de que a inflamação sistêmica originária da periodontite induziria um aumento da translocação dos receptores B₁ pré-formados em direção a membrana celular, essa modulação biológica permitiria que o sistema cininas-receptor B₁ desempenhasse suas funções fisiopatológicas em resposta ao estímulo

inflamatório sistêmico decorrente da periodontite. Para confirmação dessa hipótese torna-se necessário a realização de experimentos de imunohistoquímica e PCR (Reação em cadeia da polimerase) em tempo real.

A quarta justificativa para o resultado obtido no experimento de western-blotting consiste na hipótese de que a inflamação sistêmica originária da periodontite induziria um aumento da atividade enzimática da carboxipeptidase M. Estudos recentes demonstram que a carboxipeptidase M, enzima responsável pela degradação carboxiterminal das cininas, possui a capacidade de ativação alostérica dos receptores B₁ para cininas (ZHANG et al., 2013). A partir dessa hipótese sugere-se que a enzima carboxipeptidase M poderia ser o elo de interligação entre o estímulo inflamatório sistêmico decorrente da periodontite e o aumento da atividade funcional dos receptores B₁ para cininas.

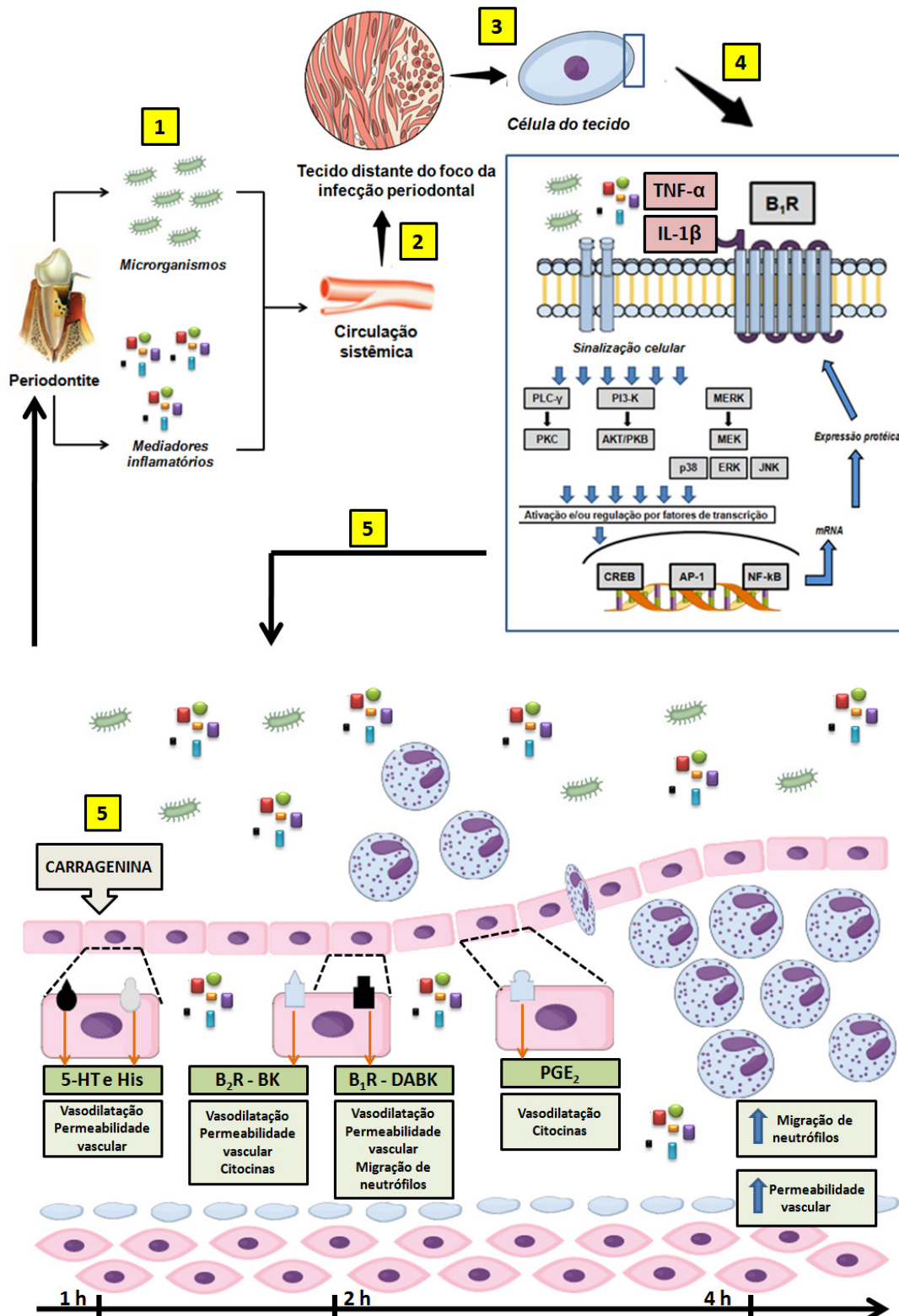
Por fim, salienta-se que o presente estudo é o primeiro trabalho científico que demonstra um aumento da atividade funcional dos receptores B₁ para cininas em um tecido distante do focal da inflamação periodontal por meio do modelo experimental de periodontite a partir da colocação de ligaduras (FIGURA 34). Esse achado pode contribuir para a compreensão fisiopatológica da relação entre periodontite e patologias sistêmicas que apresentem alterações inflamatórias relevantes no seu desenvolvimento patogênico. Nessa correlação fisiopatológica, destaca-se a relação entre periodontite e artrite reumatóide.

Estudos reportam que o mecanismo de desenvolvimento da artrite reumatóide é similar a patogênese das alterações inflamatórias sistêmicas induzidas pela periodontite crônica (ARAÚJO; MELO; LIMA, 2015). De fato, a artrite reumatóide é definida como uma doença auto-imune crônica caracterizada pelo acúmulo de infiltrado leucocitário nas membranas sinovias e aumento dos níveis dos mediadores inflamatórios, PGE₂, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, RANK-L, NO e MMPs no fluído sinovial (ANDERSSON; LI; BRENNAN, 2008). Essas alterações patológicas acarretam na sinovite e destruição inflamatória das articulações (FIRESTEIN, 2005).

Evidências consideráveis indicam a participação do sistema KKS na artrite reumatóide (CASSIM; MODY; BHOOLA, 2002). A liberação de cininas no fluído sinovial desencadeia as complicações patogênicas de vasodilatação, dor, aumento da permeabilidade vascular, migração de leucócitos e estimulação da liberação de citocinas por monócitos (SELWYN et al., 1989). Além disso, estudos em humanos demonstram o aumento da expressão dos receptores B₁ para cininas em neutrófilos

presentes no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (CASSIM et al., 2009).

FIGURA 34 – Ilustração esquemática dos achados experimentais



Nota: 1) A periodontite promovida por periodontopatógenos promove uma infecção/inflamação local. 2) Os mediadores inflamatórios e microrganismos podem migrar para a circulação sistêmica. 3) Os mediadores inflamatórios e microrganismos derivados da periodontite podem promover alterações inflamatórias sistêmicas em tecidos distantes do foco da infecção periodontal (tecido da pata). 4) Os mediadores inflamatórios induzidos pela inflamação sistêmica em decorrência da periodontite podem induzir a expressão dos receptores B₁ para cininas. No presente estudo a participação do TNF- α foi relevante nas alterações inflamatórias sistêmicas e a IL-1 β foi relevante na indução dos receptores B₁ no tecido da pata. Sugere-se que a indução dos receptores B₁ seja decorrente da sinalização celular apresentada por CALIXTO, J.B.; et al. Kinin B₁ receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *British Journal of Pharmacology*. v. 143, n. 7, p. 803-818. 2004. 5) O edema de pata induzido por carragenina demonstra que as respostas edematogênicas mediadas por 5-HT, His, BK e PGE₂ não se diferenciam entre os grupos experimentais. Em contrapartida, foi observado um aumento da atividade funcional dos receptores B₁, o que indica a possível indução deste sistema receptor induzida pela periodontite. A migração de neutrófilos e o aumento da permeabilidade vascular foram importantes, no grupo ligadura, após 4h da indução do edema de pata. Fonte: A autora.

Dessa forma, o estudo do envolvimento dos receptores B₁ para cininas na condição inflamatória sistêmica induzida pela periodontite torna-se relevante, visto a importância deste receptor na perpetuação de estímulos inflamatórios crônicos. Além disso, a contribuição patológica das cininas em situações inflamatórias crônicas indica a importância do estudo científico dos receptores B₁ na investigação biológica da relação entre periodontite e patologias inflamatórias, tais como a artrite reumatóide. Essas investigações podem contribuir futuramente com o desenvolvimento de fármacos capazes de modular as funções fisiopatológicas dos receptores B₁.

6.2 CONTRIBUIÇÃO DO SISTEMA DE CININAS NAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES INDUZIDAS PELA PERIODONTITE

A investigação da participação dos receptores B₁ e B₂ para cininas na reatividade vascular no modelo experimental de periodontite baseou-se na possível caracterização de uma correlação do sistema KKS nas alterações cardiovasculares promovidas pela patologia periodontal. Esta hipótese baseia-se na importância do sistema KKS na manutenção do tônus vascular e da indução endotelial dos receptores B₁ em situações inflamatórias crônicas (DUCHENE; AHLUWALIA, 2009).

A avaliação da participação do sistema de cininas nas alterações cardiovasculares decorrentes da periodontite iniciou-se com a avaliação dos parâmetros hemodinâmicos de pressão arterial média basal e frequência cardíaca (FIGURA 24). Nesta análise observou-se que o processo periodontal não promoveu alterações na pressão arterial média basal e na frequência cardíaca entre os grupos experimentais. Este resultado corrobora com os dados apresentados por Mendes et al. (2013) e Machado et al. (2013). Nestes estudos nenhuma alteração nos níveis de pressão arterial média basal e frequência cardíaca foram observados após 14 e 21 dias da indução da doença periodontal entre os grupos falso-operado e ligadura.

Após a avaliação dos parâmetros hemodinâmicos, deu-se a investigação da participação dos receptores B₂ para cininas na atividade vasodilatadora promovida pela BK. Os resultados obtidos demonstraram ausência de diferença estatística significativa entre os grupos experimentais o que corrobora com a interpretação da natureza constitutiva dos receptores B₂ nas células endoteliais tanto no grupo experimental falso-operado e ligadura.

Em geral a ação vascular da BK via receptor B₂, induz hipotensão a partir da redução da resistência periférica, acarretando numa redução do débito cardíaco e conseqüente hipotensão (LEEB-LUNDBERG et al., 2005). A vasodilatação promovida pela BK ocorre via mecanismos NO-dependentes e NO-independentes, sendo os mecanismos de vasodilatação NO-dependentes proeminentes (COCKCROFT et al., 1994). Prostaglandina I₂ e canais iônicos são outros mediadores secundários liberados a partir da ação das cininas no endotélio vascular (IGNARRO et al., 1987; BATENBURG et al., 2004).

O resultado da reatividade vascular para a BK demonstra que a periodontite não foi capaz de alterar a ação vasodilatadora da BK. Evidências experimentais demonstram que após 21 dias da indução da periodontite pelo modelo de ligaduras, ocorre uma redução das concentrações plasmáticas de NO (MENDES et al., 2011). Brito et al. (2013) observaram redução da vasodilatação endotélio-dependente, aumento de espécies reativas de oxigênio na artéria mesentérica e redução do conteúdo de eNOS após 28 dias da indução da periodontite.

Apesar das evidências que indicam uma alteração na via e na biodisponibilidade do NO em decorrência da doença periodontal; a avaliação da vasodilatação para a BK entre os grupos ligadura e falso-operado não apresentaram diferença estatística significativa após 14 dias da indução da periodontite. A partir

desse fato, observa-se a necessidade de realização de estudos específicos para a avaliação de possíveis alterações induzidas pela periodontite na via NO-dependente para a BK. Visto que, no presente estudo, possíveis alterações na via NO-dependente podem ter sido mascaradas por mecanismos compensatórios NO-independentes.

A primeira descrição da atividade vasoativa dos receptores B₁ para cininas ocorreu a partir da observação da ação vasoconstritora do sistema DABK/B₁R em aorta de coelhos (REGOLI; BARABE; PARK, 1977). Com poucas exceções, a ativação dos receptores B₁ promove efeitos vasoconstritores em leitos venosos e vasodilatadores em leitos arteriais. Em geral, a reatividade vascular do receptor B₁ e de seus ligantes não está presente constitutivamente, mas é acompanhada por um estímulo inflamatório (MCLEAN et al., 2000). Desta maneira, o aumento da expressão dos receptores B₁ no endotélio vascular foi previamente reconhecido em estados patológicos tais como choque séptico, diabetes, insuficiência cardíaca, hipertensão e aterosclerose (BASEI et al., 2012).

No presente estudo não foi possível caracterizar efetivamente a participação dos receptores B₁ para cininas na reatividade vascular dos animais experimentais submetidos a periodontite. Os resultados da variação da pressão arterial média e tempo de vasodilatação para o agonista B₁ DABK demonstraram uma resposta vasodilatadora inespecífica que não pode ser atribuída aos receptores B₁. Essa conclusão deve-se a não observação de uma dose-resposta vascular entre as doses de DABK e a ausência de alteração na resposta vasoativa do receptor B₁ após a utilização do antagonista B₁ DALBK.

Pode-se considerar que o processo inflamatório promovido pela periodontite não foi suficiente para promover alterações sistêmicas vasculares que culminassem com a alteração da função vasodilatadora endotelial mediada pelos receptores B₁. Drapeau et al. (1993), ao avaliar a participação dos receptores B₁ no controle da pressão arterial em ratos, observaram que baixas doses de LPS aumentaram a expressão dos receptores B₁ mas a correlação com alterações na pressão arterial basal não foram observadas mesmo após a infusão de agonistas ou antagonistas dos receptores B₁.

Este resultado experimental contrapõe-se ao estudo de McLean et al. (1999). Ao avaliar a expressão dos receptores B₁ para cininas em coração endotoxêmico de ratos, McLean e colaboradores (1999) demonstraram que o tratamento *in vivo* com

LPS promoveu uma resposta hipotensiva ao DABK que foi antagonizada pelo DALBK.

Apesar da observação experimental de que os receptores B₁ para cininas não participam efetivamente na reatividade vascular em animais experimentais submetidos a periodontite, salienta-se que o presente estudo avaliou a contribuição global deste sistema receptor nas alterações da pressão arterial média após a infusão do agonista B₁ DABK, não avaliando especificamente leitos venosos e/ou arteriais de interesse.

A avaliação específica da contribuição endotelial dos receptores B₁ para cininas em leitos venosos e/ou arteriais específicos mostra-se relevante, visto a observação experimental da contribuição cardioprotetiva da ativação dos receptores B₁ nas artérias coronárias em situações de isquemia do miocárdio (POTIER et al., 2013). Como também nas situações de hipertensão portal (BASEI et al., 2012) e contribuição na regulação vascular dos leitos arteriais mesentéricos (SOARES DE MOURA et al., 2004).

Visto a importância dos receptores B₁ e B₂ na modulação da atividade da eNOS, a cooperatividade na ação vasoativa entre estes receptores e as alterações na biodisponibilidade de NO promovidas pela periodontite, estudos complementares sobre a correlação entre disfunção endotelial, sistema KKS e periodontite são necessários para correlacionar estes efeitos fisiopatológicos com as alterações da vasodilatação endotélio-dependente promovidas pela doença periodontal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados permitem concluir que:

- A periodontite promove alterações sistêmicas, visto que o edema de pata induzido por carragenina foi estatisticamente superior no grupo ligadura em relação ao grupo falso-operado e ao grupo controle.
- A periodontite não influencia significativamente a participação dos receptores B_2 para cininas a partir da indução do edema de pata mediado pela BK entre os grupos falso-operado e ligadura.
- A diferença estatística observada no aumento do volume da pata entre os grupos falso-operado e ligadura no edema de pata mediado pelo agonista B_1 DABK, e a redução da intensidade do edema a partir do antagonista B_1 DALBK, caracterizam a indução funcional dos receptores B_1 para cininas em decorrência da inflamação sistêmica promovida pela periodontite.
- As atividades inflamatórias dos agentes edematogênicos não relacionados ao sistema de cininas (serotonina, histamina e PGE_2) não são afetadas pela inflamação sistêmica oriunda da doença periodontal.
- A periodontite promove após 4h da indução do edema de pata mediado por carragenina um aumento da migração de neutrófilos no tecido da pata em ratos.
- A periodontite promove após 4h da indução do edema de pata mediado por carragenina um aumento da permeabilidade vascular no tecido da pata em ratos.
- A quantificação plasmática de $TNF-\alpha$ 3 dias após a indução da periodontite indica que essa citocina é relevante na resposta inflamatório sistêmica induzida pela periodontite.
- Os níveis plasmáticos de $IL-1\beta$ não se diferenciam entre os grupos experimentais ligadura e falso-operado após 3, 7 e 14 dias da indução da periodontite.
- A quantificação tecidual de $TNF-\alpha$ demonstra que essa citocina não contribui para a indução dos receptores B_1 no tecido da pata de ratos após 14 dias da indução da periodontite.

- A quantificação tecidual de IL-1 β demonstra que essa citocina contribui para a indução dos receptores B₁ no tecido da pata de ratos após 14 dias da indução da periodontite.
- Após 14 dias da indução da periodontite pela colocação das ligaduras em ratos não são observadas alterações na frequência cardíaca e na pressão arterial média basal.
- Não há alteração na redução da pressão arterial induzida por agonista do receptor B₂ entre os grupos falso-operado e ligadura. Embora a observação da ocorrência de alterações na inflamação induzida por agonista B₁ em animais com periodontite, não foi encontrado alterações na resposta pressórica induzida por este agente.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

- ABUSLEME, L.; et al. The subgingival microbione in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME Journal*. v. 7, p. 1016-1025. 2013.
- ACCARINI, R.; DE GODOY, M.F. Periodontal disease as a potential risk factor for acute coronary syndromes. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. v. 8, n. 5, p. 592-596. 2006.
- AHLUWALIA, A.; PERRETTI, M. Involvement of bradykinin B₁ receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 beta in vivo in the mouse. *Journal of Immunology*. v. 156, n. 1, p. 269-274. 1996.
- AKBARY, A.; WIRTH, K.J.; SCHOLKENS, B.A. Efficacy and tolerability of icatibant (Hoe 140) in patients with moderately severe chronic bronchial asthma. *Immunopharmacology*. v. 33, n. 103, p. 238-242. 1996.
- AIMETTI, M.; ROMANO, F.; NESSI, F. Microbiologic analysis of periodontal pockets and carotid atheromatous plaques in advanced chronic periodontitis patients. *Journal of Periodontology*. v. 8, n. 9, p. 1718-1723. 2007.
- AMANO, A. Host-parasite interactions in periodontitis: microbial pathogenicity and innate immunity. *Periodontology 2000*. v. 54, p. 9-14. 2010.
- ANDERSSON, A.K.; LI, C.; BRENNAN, F.M. Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research*. v. 10, p. 204. 2008.
- ANDRIANKAJA, O.M.; et al. Periodontal disease and risk of myocardial infarction: the role of gender and smoking. *European Journal of Epidemiology*. v. 22, p. 699-705. 2007.
- ARAÚJO, V.M.A.; MELO, I.M.; LIMA, V. Relationship between periodontitis and rheumatoid arthritis: Review of the literature. *Mediators of Inflammation*. v. 2015, p. 15. 2015.
- ARAÚJO, A.A.; et al. Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF- α , down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. *Journal of Clinical Periodontology*. v. 40, p. 1104-1111. 2013.
- AZOUBEL, M.C.; et al. Comparison of etoricoxib and indomethacin for the treatment of experimental periodontitis in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 40, n. 1, p. 115-125. 2007.
- BAINBRIDGE, B.; et al. Role of *Porphyromonas gingivalis* phosphoserine enzyme SerB in inflammation, immune response, and induction of alveolar bone resorption in rats. *Infection and Immunology*. v. 78, p. 4560-4569. 2010.
- BAS, M.; et al. Angioedema induced by cardiovascular drugs: new players join old friends. *Allergy*. v. 10, p. 1196-1200. 2015.

BASEI, F.L.; et al. Endothelium dependent expression and underlying mechanisms of des-Arg9-bradykinin induced B₁R-mediated vasoconstriction in rat portal vein. *Peptides*. v. 37, n. 2, p. 216-224. 2010.

BATENBURG, W.W.; et al. Mediators of bradykinin-induced vasorelaxation in human coronary microarteries. *Hypertension*. v. 43, n. 2, p. 488-492. 2004.

BERLSTROM, D.; et al. Does a causal relation between cardiovascular disease and periodontitis exist? *Microbes and Infection*. v. 14, n. 5, p. 411-418. 2012.

BHAFT, K.R.; MEHTA, R.K.; SHRIVASTAVA, P.N. A simple method for recording anti-inflammatory effect on rat paw edema. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. v. 21, p. 399-400. 1977.

BHoola, K.D.; FIGUEROA, C.D.; WORTHY, K. Biorregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacology Reviews*. v. 44, n. 1, p. 1-80. 1992.

BHoola, K.; et al. Kallikrein and kinin receptor expression in inflammation and cancer. *Biological Chemistry*. v. 382, n. 1, p. 77-89. 2001.

BJORNSSON, M.J.; et al. The influence of diet consistence, drinking water and bedding on periodontal disease in Sprague-Dawley rats. *Journal of Periodontal Research*. v. 38, n. 6, p. 543-550. 2003.

BLAUKAT, A.; DIKIC, I. Activation of sphingosine kinase by the bradykinin B₂ receptor and its implication in regulation of the ERK/MAP kinase pathway. *Biological Chemistry*. v. 382, n. 1, p. 135-139. 2001.

BOCKMAN, S.; PAEGELOW, I. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. v. 68, n. 5, p. 587-592. 2000.

BOGAR, L.J.; et al. Enhanced bradykinin-stimulated prostaglandin release in the acutely inflamed guinea pig gallbladder is due to new synthesis of cyclooxygenase 1 and prostacyclin synthase. *Journal of Surgical Research*. v. 84, n. 1, p. 71-76. 1999.

BOISSONNAS, R.A.; GUTTMANN, A.; JAQUENOUD, P.A. Synthese de la L-arginyl-L-propyl-L-propyl-glycyl-L-phenylalanyl-seryl-L-propyl-L-phenylalanyl-L-arginine, un nonapeptide presentat le proprietes de la bradykinine. *Helvetica Chimica Acta*. v. 43, p. 1349-1355. 1960.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. v. 72, p. 248-254. 1976.

BRADLEY, P.P.; et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*. v. 78, n. 3, p. 206-209. 1982.

BRANCO-DE-ALMEIDA, L.S.; et al. Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat model of ligature-induced periodontitis. *Journal of Periodontology*. v. 83, n. 5, p. 664-671. 2012.

BRAUNWALD, E. Cardiovascular medicine at turn of the millennium: triumphs, concern and opportunities. *New England Journal of Medicine*. v. 337, n. 19, p. 1360-1369. 1997.

BRECHTER, A.B.; et al. Kinin B₁ and B₂ receptor expression in osteoblasts and fibroblasts is enhanced by interleukin-1 and tumor necrosis factor- α . Effects dependent on activation of NF- κ B and MAP kinases. *Bone*. v. 43, n. 1, p. 72-83. 2008.

BRITO, L.C.W.; et al. Experimental periodontitis promotes transient vascular inflammation and endothelial dysfunction. *Archives of Oral Biology*. v. 58, p. 1187-1198. 2013.

BRUNIUS, G.; et al. Bradykinin upregulates IL-8 production in human gingival fibroblasts stimulated by interleukin-1 β and tumor necrosis factor α . *Regulatory Peptides*. v. 126, n. 3, p. 183-188. 2005.

BRUNNER, H.; et al. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factor and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *Journal of Hypertension*. v. 23, n. 2, p. 233-246. 2005.

BUDUNELI, E.; et al. Effects of combined systemic administration of low-dose doxycycline and alendronate on endotoxin-induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*. v. 75, n. 11, p. 1516-1523. 2004.

BUHLIN, K.; et al. Risk factors for atherosclerosis in cases with severe periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. v. 36, p. 541-549. 2009.

BURSCH, R.M.; AXELROD, J. Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 84, n. 18, p. 6374-6378. 1987.

CALIXTO, J.B.; et al. Kinin B₁ receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *British Journal of Pharmacology*. v. 143, n. 7, p. 803-818. 2004.

CAMPOS, M.M.; SOUZA, G.E.P.; CALIXTO, J.B. Upregulation of B₁ receptor mediating des-Arg⁹-BK induced rat paw by systemic treatment with bacterial endotoxin. *British Journal of Pharmacology*. v. 117, n. 5, p. 793-798. 1996.

CAMPOS, M.M.; SOUZA, G.E.P.; CALIXTO, J.B. Modulation of kinin B₁ but not B₂ receptors-mediated rat paw edema by IL-1 β and TNF α . *Peptides*. v. 19, n. 5, p. 1269-1276. 1998.

CAMPOS, M.M.; SOUZA, G.E.P.; CALIXTO, J.B. In vivo B₁ kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor κ B pathways. *British Journal of Pharmacology*. v. 127, n. 8, p. 1851-1859. 1999.

CAMPOS, M.M.; et al. The role of migrating leucocytes in IL-1 β induced upregulation of kinin B₁ receptors in rats. *British Journal of Pharmacology*. v. 135, n. 5, p. 1107-1114. 2002.

CANTLEY, M.D.; et al. Pre-existing periodontitis exacerbates experimental arthritis in a mouse model. *Journal of Clinical Periodontology*. v. 38, n. 6, p. 532-541. 2011.

CAREY, R.M.; PADIA, S.H. Angiotensin AT₂ receptors: control of renal sodium excretion and blood pressure. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. v. 19, p. 84-87. 2008.

CASSIM, B.; MODY, G.; BHOOLA, K. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. *Pharmacology & Therapeutics*. v. 94, p. 1-34. 2002.

CASSIM, B.; et al. Kallikreins, kininogens and kinin receptors on circulating and synovial fluid neutrophils: role in kinin generation in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. v. 48, p. 490-496. 2009.

CELERMAJER, D.S.; et al. Endothelial dysfunction: Does it matter? Is it reversible? *Journal of American College of Cardiology*. v. 30, p. 325-333. 1997.

CHAHINE, R.; et al. Protective effects of bradykinin on the ischaemic heart: implication of the B₁ receptor. *British Journal of Pharmacology*. v. 108, n. 2, p. 318-322. 1993.

CHEN, H.; et al. Platelet-activating factor levels of serum and gingival crevicular fluid in nonsmoking patients with periodontitis and/or coronary heart disease. *Clinical Oral Investigations*. v. 14, p. 629-636. 2010.

CHRISTIANSEN, S.C.; et al. Up-regulation of functional B₁ receptors in allergic airway inflammation. *Journal of Immunology*. v. 169, p. 2054-2060. 2002.

COCKCROFT, J.R.; et al. Inhibition of bradykinin-induced vasodilatation in human forearm vasculature by icatibant, a potent B₂-receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*. v. 38, n. 4, p. 317-322. 1994.

COSTALONGA, M., HERZBERG, M.C. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunology Letters*. v. 162, p. 22-38. 2014.

COSTA-NETO, C.M.; et al. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. *International Immunopharmacology*. v. 8, n. 2, p. 135-142. 2008.

CRAIG, R.G.; et al. Periodontal diseases and systemic inflammation. *Seminars in Dialysis*. v. 26, n. 1, p. 23-26. 2013.

CUNHA-CRUZ, J.; NADANOVSKY, P. Doenças periodontais causam doenças cardiovasculares? Análise das evidências epidemiológicas. *Cadernos de Saúde Pública*. v. 19, n. 2, p. 357-368. 2003.

DARVEAU, R.P.; et al. *Porphyromonas gingivalis* lipopolisaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infection and Immunity*. v. 75, n. 9, p. 5041-5051. 2004.

DEBLOIS, D.; BOUTHILLIER, J.; MARCEAU, F. Effect of glucocorticoids, monokines and growth factors on the spontaneously developing responses of the rabbit isolated aorta to des-Arg⁹-bradykinin. *British Journal of Pharmacology*. v. 93, n. 4, p. 969-977. 1988.

DELBOSC, S.; et al. *Porphyromonas gingivalis* participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PLoS One*. v. 6, p. e18679. 2011.

DEMME, R.T., Kocher T, Schwahn C, Volzke H, Jacobs DR.Jr, Desvarieux M. Refining exposure definitions for studies of periodontal disease and systemic disease associations. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. v. 36, n. 6, p. 493-502. 2008

DETERT, J.; et al. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis Research & Therapy*. v. 12, n. 5, p. 218-224. 2010.

DEWHIRST, F.E.; et al. The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*. v. 192, p. 5002-5017. 2010.

DE BENEDETTO, A.; et al. Histamine and skin barrier: are histamine antagonists useful for the prevention of treatment of atopic dermatitis? *Journal of Clinical Medicine*. v. 4, n. 4, p. 741-755. 2015.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carraggenan and turpentine. *Journal of Pathology*. v. 104, n. 1, p. 15-29. 1971.

DI ROSA, M.; SORRENTINO, L. Some pharmacodynamic properties of carrageenin in the rat. *British Journal of Pharmacology*. v. 38, n. 1, p. 214-220. 1970.

DI ROSA, M.; SORRENTINO, L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenin. *European Journal of Pharmacology*. v. 4, p. 340-342. 1968.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D.A. Screens for anti-inflammatory drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. v. 23, n. 4, p. 297-298. 1971.

DORNELLES, F. N.; et al. In vivo up-regulation of kinin B₁ receptors after treatment with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in rat paw. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v. 330, n. 3, p. 756-763. 2009.

DRAPEAU, G.; et al. Development and in vivo evaluation of metabolically resistant antagonists of B₁ receptors for kinins. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v. 266, n. 1, p. 192-199. 1993.

DRAY, A.; PERKINS, M.N. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends in Neurosciences*. v. 16, p. 99-104. 1993.

DUCHENE, J.; AHLUWALIA, A. The kinin B₁ receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease. *Current Opinion in Pharmacology*. v. 9, n. 2, p. 125-131. 2009.

DUCHENE, J.; et al. A novel inflammatory pathway involved in leukocyte recruitment: role for the kinin B₁ receptor and the chemokine CXCL5. *Journal of Immunology*. v. 179, n. 7, p. 4849-4856. 2007.

EKUNI, D.; et al. Periodontitis-induced lipid peroxidation in rat descending aorta is involved in the initiation of atherosclerosis. *Periodontal Research*. v. 44, n. 4, p. 434-443. 2009.

ELLIOT, D.F.; HORTON, E.W.; LEWIS, G.P. Actions of pure bradykinin. *Journal of Physiology*. v. 153, p. 473-480. 1960.

EMANUELI, C.; et al. Adenovirus-mediated human tissue kallikrein gene delivery induces angiogenesis in normoperfused skeletal muscle. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. v. 20, n. 11, p. 2379-2385. 2000.

EMANUELI, C.; et al. Targeting kinin B₁ receptor for therapeutic neovascularization. *Circulation*. v. 105, p. 360-366. 2002.

ENQUIST, J.; et al. Kinins promote B₂ receptor endocytosis and delay constitutive B₁ receptor endocytosis. *Molecular Pharmacology*. v. 71, n. 2, p. 494-507. 2007.

ERDOS, E.G. Angiotensin I converting enzyme through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension*. v. 16, n. 4, p. 363-370. 1990.

FEIN, A.M.; et al. Treatment of severe systemic inflammatory response syndrome and sepsis with a novel bradykinin antagonist, deltibant (CP-0127), Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CP-0127 SIRS and sepsis study group. *Journal of American Medical Association*. v. 277, p. 482-487. 1997.

FIGUEROA, C.D.; et al. Kinin B₁ receptor regulates interactions between neutrophils and endothelial cells by modulating the levels of Mac-1, LFA-1 and intercellular adhesion molecule-1. *Innate Immunology*. v. 21, n. 3, p. 289-304. 2014.

FIRESTEIN, G.S. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Rheumatology*. v. 1, p. 39-44. 2002.

FITZPATRICK, R.E.; WIJEYEWICKREMA, L.C.; PIKE, R.N. The gingipains: scissors and glue of the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. *Future Microbiology*. v. 4, n. 4, p. 471-487. 2009.

FRIEDEWALD, V.E.; et al. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editor's Consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *American Journal of Cardiology*. v. 104, n. 1, p. 59-68. 2009.

GALVÃO, M.P.; et al. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. *Pesquisa Odontológica Brasileira*. v. 17, n. 1, p. 56-62. 2003.

GILLIGAN, J.P.; et al. Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. *Inflammation*. v. 18, n. 3, p. 285-292. 1994.

GLURICH, I.; et al. Systemic inflammation in cardiovascular and periodontal disease: comparative study. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. v. 9, p. 425-432. 2002.

GOMES, M.S.; et al. Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? A systemic review and meta-analysis. *JOE*. v. 39, n. 10, p. 1205-1217. 2013.

GOMES-FILHO, I.S.; et al. Chronic periodontitis and C-reactive protein levels. *Journal of Periodontology*. v. 82, p. 969-978. 2011.

GRIESBACHER, T.; et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of the bradykinin antagonist, icatibant (Hoe 140), against an extract from *Porphyromonas gingivalis*. *British Journal of Pharmacology*. v. 4, n. 112, p. 1004-1006. 1994.

GROVES, P.; et al. Role of endogenous bradykinin in human coronary vasomotor control. *Circulation*. v. 92, n. 12, p. 3424-3420. 1995.

GURKAN, A.; et al. Therapeutic efficacy of vasoactive intestinal peptide in *Escherichia coli* lipopolysaccharide-induced experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*. v. 90, n. 10., p. 1655-1664. 2009.

GUTIERREZ-VENEGAS, G.; ARRUGUIN-CANO, J.A. Bradykinin promotes TLR2 expression in human gingival fibroblasts. *International Immunopharmacology*. v. 11, n. 12, p. 2079-2085. 2011.

HAJISHENGALLIS, G.; et al. Mechanism and implications of CXCR4-mediated integrin activation by *Porphyromonas gingivalis*. *Molecular Oral Microbiology*. 2013.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*. v. 15, n. 1, p. 30-44. 2015.

HAJISHENGALLIS, G. Complement and periodontitis. *Biochemical Pharmacology*. v. 80, p. 1992-2001. 2010.

HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R.J.; GRAVES, D.T. The enduring importance of animal models in understanding periodontal disease. *Virulence*. v. 6, n. 3, p. 229-235. 2015.

HAROKOPAKIS, E.; et al. TLR2 transmodulates monocyte adhesion and transmigration via Rac-1 and PI3K-mediated inside-out signaling in response to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Journal of Immunology*. v. 176, p. 7645-7656. 2006.

HASHIMOTO, K.; et al. Changes in components of kinin system and hemodynamics in acute myocardial infarction. *American Heart Journal of Hypertension Supply*. v. 95, n. 5, p. 619-625. 1978.

HAWGOOD, B.J. Maurício Rocha e Silva MD: Snake venom, bradykinin and the rise of autopharmacology. *Toxicon*. v. 35, n. 11, p. 1569-1580. 1997.

HAYASHI, C.; et al. Pathogen-induced inflammation at sites distant from oral infection: bacterial persistence and induction of cell-specific innate immune inflammatory pathways. *Molecular Oral Microbiology*. v. 25, n. 5, p. 305-316. 2010.

HERRERA, B.S.; et al. Local and cardiorenal effects of periodontitis in nitric oxide-deficient hypertensive rats. *Archives of Oral Biology*. v. 35, n. 11, p. 1569-1580. 2011.

HINODE, D.; et al. Generation of plasma kinin by three types of protease from *Porphyromonas gingivalis*. *Archives of Oral Biology*. v. 37, n. 10, p. 859-861. 1992.

HIGASHI, H.; et al. Bradykinin-activated transmembrana signals are coupled via No or Ni to production of inositol 1,4,5-triphosphate, a second messenger in NG108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 83, n. 4, p. 942-946. 1986.

HIGASHI, Y.; et al. Periodontal infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients. *Hypertension*. v. 51, n. 2, p. 446-453. 2008.

HIGASHI, Y.; et al. Oral infection-inflammatory pathway, periodontitis, is a risk factor for endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. v. 206, n. 2, p. 604-610. 2009.

HOKAMURA, K.; et al. Molecular analysis of aortic intimal hyperplasia infection in mice with endothelial damage. *Journal of Periodontal Research*. v. 45, n. 3, p. 337-344. 2010.

HOLT, S.C.; et al. Virulence factos of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontoly*. v. 20, p. 168-238. 2000.

HOLTFRETER, B.; et al. Periodontitis is associated with endothelial dysfunction in a general population: a cross-sectional study. *PLoS One*. v. 8, n. 12, p. e84603. 2013.

HOLZHAUSEN, M.; et al. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*. v. 73, n. 9, p. 1013-1016. 2002.

HOTCHKISS, R.S.; et al. cell death. *New England Journal of Medicine*. v. 361, p. 1570-1583. 2009.

HOWL, J.; PAYNE, S.J. Bradykinin receptors as a therapeutic target. *Expert Opinion Therapeutic Targets*. v. 7, p. 277-285. 2003.

HU, S.W.; et al. Transvascular dissemination of *Porphyromonas gingivalis* from a sequestered site is dependent upon activation of the kallikrein-kinin pathway. *Journal of Periodontal Research*. v. 41, n. 3, p. 200-207. 2006.

HUCK, O.; et al. *Porphyromonas gingivalis*-impaired innate immune response via NLRP3 proteolysis in endothelial cells. *Innate Immunology*. v. 21, p. 65-72. 2014.

IGNARRO, L.J.; et al. Mechanisms of endothelium dependent vascular smooth muscle relaxation elicited by bradykinin and VIP. *American Journal of Physiology*. v. 253, n. 5, pp. 1074-1082. 1987.

INABA; H., AMANO, A. Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases – from molecular mechanisms to clinical cases: implication of periodontal diseases in development of systemic diseases. *Journal of Pharmacological Sciences*. v. 113, n. 2, p. 103-109. 2010.

ISHIGAI, Y.; et al. Role of bradykinin-NO pathway in prevention of cardiac hypertrophy by ACE inhibitor in rat cardiomyocytes. *American Journal of Physiology*. v. 273, n. 6, p. 2659-2663. 1997.

KAPLAN, A.P.; JOSEPH, K.; SILVERBERG, M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v. 109, n. 2, p. 195-209. 2002.

JIMENEZ-DALMARONI, M.J.; GERSWHIN, M.E.; ADAMOPOULOS, I.E. The critical role of toll-like receptors – From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmunity*. v. S1568-9972, n. 15. 2015.

KAPLANSKI, J.; et al. LF 16-0687 MS, a bradykinin B₂ receptor antagonist, reduces brain edema and improves long-term neurological function recovery after closed head trauma in rats. *Journal of Neurotrauma*. v. 19, n. 8, p. 953-964. 2002.

KASSEBAUM, N.J.; et al. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *Journal of Dental Research*. v. 93, p. 1045-1053. 2014.

KATS, et al. Inhibition of microsomal prostaglandin E synthase-1 by aminothiazoles decreases prostaglandin E₂ synthesis *in vitro* and ameliorates experimental periodontitis *in vivo*. *The FASEB Journal*. v. 27, p. 2328-2341. 2013.

KAWAHARA, K.; et al. Prostaglandin E₂-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1851, n. 4, p. 414-421. 2015.

KEBSCHULL, M.; DEMMER, R.T.; PAPAPANOU, P.N. Gum bug, leave my heart alone! Epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. v. 89, n. 9, p. 879-902. 2010.

KHASAR, S.G.; MIAO, F.J.; LEVINE, J.D. Inflammation modulates the contribution of receptor-subtypes to bradykinin-induced hyperalgesia in the rat. *Neuroscience*. v. 69, n. 2, p. 685-690. 1995.

KHOLY, K.E.; GENCO, R.J.; VAN DYKE, T.E. Oral infections and cardiovascular disease. *Trends Endocrinology & Metabolism*. v. 26, n. 6, p. 315-321. 2015.

KIKKERET, R.; et al. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative periodontal bacteria. *Oral Microbiology Immunology*. v. 22, p. 145-151. 2007.

- KIM, S.R.; et al. Glycyrrhetic acid inhibits *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced vascular permeability via the suppression of interleukin-8. *Inflammation Research*. v. 62, n.2, p. 145-154. 2012.
- KIMURA, S.; et al. Induction of experimental periodontitis in mice with *Porphyromonas gingivalis* – adheres ligatures. *Journal of Periodontology*. v. 71, n. 7, p. 1167-1173. 2000.
- KOLENBRANDER, P.E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annual Review of Microbiology*. v. 54, p. 413-437. 2000.
- KOYAMA, S; et al. Bradykinin stimulates lung fibroblasts to release neutrophil and monocyte chemotactic activity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. v. 22, n. 1, p. 75-84. 2000.
- KUHR, F.; et al. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B₁ and B₂ receptors. *Neuropeptides*. v. 44, n. 2, p. 145-153. 2010.
- LAKIO, L.; et al. Pro-atherogenic properties of lipopolysaccharide from the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Endotoxin Research*. v. 12, p. 57-64. 2006.
- LAMB, M.E.; et al. Human B₁ and B₂ bradykinin receptors and their agonists target caveolae-related lipid rafts to different degrees in HEK293 cells. *Biochemistry*. v. 41, n. 48, p. 14347-14347. 2002.
- LARRIVEE, J.F.; et al. Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B₁ receptors induced by tissue injury. *Journal of Immunology*. v. 160, n. 3, p. 1419-1426. 1998.
- LEEB-LUNDBERG, I.M.F.; et al. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacological Reviews*. v. 57, n. 1, p. 27-77. 2005.
- LEEB-LUNDBERG, L.M.; et al. The human B₁ bradykinin exhibits high ligand-independent, constitutive activity. Roles of residues in the fourth intracellular and third transmembrane domains. *Journal of Biological Chemistry*. v. 276, n. 12, p. 8785-8792. 2001.
- LEONG, X.F.; et al. Association between hypertension and periodontitis: possible mechanisms. *Scientific World Journal*. v. 2014, p. 768237. 2014.
- LERNER, U.H. Bradykinin synergistically potentiates interleukin-1 induced bone resorption and prostanoid biosynthesis in neonatal mouse calvarial bones. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 175, n. 3, p. 775-783. 1991.
- LEVESQUE, L.; et al. Regulation of kinin-induced contraction and DNA synthesis by inflammatory cytokines in the smooth muscle of the rabbit aorta. *British Journal of Pharmacology*. v. 116, n. 1, p. 1673-1679. 1995.

- LIU, R.; et al. *Porphyromonas gingivalis* and *E. coli* lipopolisaccharide exhibit different systemic but similar local induction of inflammatory markers. *Journal of Periodontology*. v. 79, n. 7, p. 1241-1247. 2008.
- QUITTERER, U.; ABDALLA, S. Vasopressor meets vasodepressor: the AT1-B2 receptor heterodimer. *Biochemical Pharmacology*. v. 88, p. 284-290. 2014.
- MACHADO, W.M. *O efeito da sinvastatina em alterações cardiovasculares e na perda óssea induzida pela periodontite*. 2013, 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.
- MADRIGAL, A.G.; et al. Pathogen-mediated proteolysis of the cell death regulator RIPK 1 and the host defense modulator RIPK2 in human aortic endothelial cells. *PLoS One Pathogens*. v. 8, p. e1002723. 2012.
- MAEKAWA, T.; et al. Genetic and intervention studies implicating complement C3 as a major target for the treatment of periodontitis. *Journal of Immunology*. v. 192, n. 12, p. 6020-6027. 2014.
- MAGNOLIUS, H.S.; et al. Altered urinary kallikrein excretion in rats with hypertension. *Circulation Research*. v. 30, p. 358-362. 1972.
- MARCEAU, F.; HESS, J.F.; BACHVAROV, D.R. The B₁ receptors for kinins. *Pharmacological Reviews*. v. 50, p. 357-362. 1998.
- MARTIN, Y.; AVENDANO, C.; PIEDRAS, M.J. Evaluation of Evans blue extravasation as a measure of peripheral inflammation. *Nature – Protocol exchange*. Disponível em: <http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/1919>. 2010.
- MATTILA, K.J.; et al. Association between dental healthy and acute myocardial infarction. *British Medical Journal*. v. 298, p. 779-782. 1989.
- MAURER, M.; et al. New topics in bradykinin research. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v. 66, n. 11, p. 1397-1406. 2011.
- MURAYAMA, M.; et al. Studies on the constituents of aconitum species: IX. The pharmacological properties of the pyro-type aconitine alkaloids, components of processed aconite powde Koko-bushi-matsu: analgesic, anti-inflammatory and toxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 35, n. 2, p. 159-164. 1991.
- MCEACHERN, A.E.; et al. Expression of a rat B2 bradykinin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 88, n. 17, p. 7724-7728. 1991.
- MCLEAN, P.G.; PERRETTI, M.; AHLUWALIA, A. Kinin B₁ receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovascular Research*. v. 48, n. 2, p. 194-210. 2000.
- MEDEIROS, R.; et al. Bradykinin B₁ receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein. A critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kB signaling pathways. *Circulation Research*. v. 94, n. 10, p. 1375-1382. 2003.

MENDES, R.T. *Efeitos cardiovasculares da inibição da ciclooxigenase 2 em um modelo experimental de periodontite induzida por ligadura*. 2012, 85f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2012.

MENDES, R.T.; et al. Periodontitis increases vascular cyclooxygenase-2: potential effect on vascular tone. *Journal of Periodontal Research*. v. 49, p. 85-92. 2014.

MEYLE, J.; CHAPPLE, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology 2000*. v. 69, p. 7-17. 2015.

MODEER, T.; ANDUREN, I.; YUCEL-LINDBERG, T. Bradykinin synergistically stimulates interleukin 6 production in human gingival fibroblasts challenged with interleukin 1 or tumor necrosis factor α . *Cytokine*. v. 10, n. 1, p. 26-31. 1998.

MONTEIRO, AM.; et al. Cardiovascular disease parameters in periodontitis. *Journal of Periodontology*. v. 80, p. 378-388. 2009.

MOUTSOPOULOS, N.M.; et al. Defective neutrophil recruitment in leukocyte adhesion deficiency type I disease causes local IL-17-driven inflammatory bone loss. *Science Translational Medicine*. 2014.

NAKAJIMA, T.; et al. Periodontitis-associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease. *Journal of Periodontal Research*. v. 45, p. 116-122. 2010.

NAKATANI, S.; et al. Recent picture of infective endocarditis in Japan-lessons from cardiac disease registration (CADRE-IE). *Circulation Journal*. v. 77, n. 6, p. 1558-1564. 2013.

NAKAYAMA, K. *Porphyromonas gingivalis* cell-induced hemagglutination and platelet aggregation. *Periodontology 2000*. v. 54, p. 45-52. 2010.

NESSE, W.; et al. Increased prevalence of cardiovascular and auto-immune diseases in periodontitis patients: a cross-sectional study. *Journal of Periodontology*. v. 81, p. 1622-1628. 2010.

NISHIZUKA, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*. v. 258, n. 5082, p. 607-614. 1992.

NORBERG, J.K.; et al. Targeting inflammation: multiple innovative ways to reduce prostaglandin E₂. *Pharmaceutical Patent Analyst*. v. 2, n. 2, p. 265-288. 2013.

OFFENBACHER, S.; et al. Results from the periodontitis and vascular events (PAVE) study: a pilot multicentered, randomized, controlled trial to study effects of periodontal therapy in a secondary prevention model of cardiovascular disease. *Journal of Periodontology*. v. 80, n. 2, p. 190-201. 2009.

OTOMO-CORGEL, D.A.; et al. State of the science: chronic periodontitis and systemic health. *Journal of Evidence-Based Dental Practice*. v. 12, n. 3, p. 20-28. 2012.

OZ, H.S; PULEO, D.A. Animal models for periodontal disease. *Journal Biomedicine and Biotechnology*. v. 2001, n. 754857, p. 1-8. 2011.

PALM, F.; et al. Biomarkers of periodontitis and inflammation in ischemic stroke: a case-control study. *Innate Immunity*. v. 10, n. 5, p. 1-8. 2013.

PALMER, R.M.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. v. 327, n. 6122, p. 524-526. 1987.

PARENTI, A.; et al. The bradykinin/B₁ receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway. *FASEB Journal*. v. 15, n. 8, p. 1487-1489. 2001.

PHAGOO, S.B.; POOLE, S.; LEED-LUNDBERG, L.M. Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1-beta shift the repertoire of receptor subtypes from B₂ to B₁ in human lung fibroblasts. *Molecular Pharmacology*. v. 56, n. 2, p. 325-333. 1999.

PIZZO, G.; et al. Dentistry and internal medicine: from the focal infection theory to the periodontal medicine concept. *European Journal of Internal Medicine*. v. 21, p. 496-502. 2010.

POBER, J.S.; MIN, W.; BRADLEY, J.R. Mechanisms of endothelial dysfunction, injury, and death. *Annual Reviews of Pathology Mechanisms of Diseases*. v. 4, p. 71-95. 2009.

POTIER, L.; et al. Selective kinin receptor agonists as cardioprotective agents in myocardial ischemia and diabetes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v. 346, n. 1, p. 23-30. 2013.

PRADO, G.N.; et al. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B₂ and B₁ receptors. *Journal of Cellular Physiology*. v. 193, n. 3, p. 275-286. 2002.

PROUD, D.; et al. Inhibition of the response to nasal provocation with bradykinin by HOE-140: efficacy and duration of action. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. v. 73, n. 3, p. 820-826. 1995.

PROUD, F. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annual Review of Immunology*. v. 6, p. 49-83. 1988.

PUSSINEN, P.J.; et al. Endotoxemia, immune response to periodontal pathogens, and systemic inflammation associate with incident cardiovascular disease events. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. v. 27, p. 1433-1439. 2007.

QUEIROZ-JUNIOR, C.M.; et al. Role of systemic and local administration of selective inhibitors of cyclooxygenase 1 and 2 in an experimental model of periodontitis disease in rats. *Journal of Periodontal Research*. v. 44, n. 2, p. 153-160. 2009.

REGOLI, D.; BARABE, J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacology Reviews*. v. 32, p. 1-46. 1980.

REGOLI, D.; BARABE, K.; PARK, W.K. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. v. 55, n. 4, p. 855-867. 1977.

REGOLI, D.; GOBEIL JR, F. Critical insights into the beneficial and protective actions of the kallikrein-kinin system. *Vascular Pharmacology*. v. 64, p. 1-10. 2015.

REGOLI, D.; PLANTE, G.E.; GOBEIL JR., F. Impact of kinins in the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacology & Therapeutics*. v. 135, p. 94-111. 2012.

RHALEB, N.E.; et al. Receptors for kinins in isolated arterial vessels of dogs. *European Journal of Pharmacology*. v. 162, n. 3, p. 419-427. 1989.

ROCHA, A.C.C.; et al. Assessment of TNF α contribution to the functional up-regulation of kinin B₁ receptor in the mouse paw after treatment with LPS. *International Immunopharmacology*. v. 5, n. 11, p. 1593-1600. 2005.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W.T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma by snake venoms and by trypsin. *American Journal of Physiology*. v. 156, n. 2, p. 261-273. 1949.

ROTH, G.A.; et al. Infection with a periodontal pathogen induces procoagulant effects in human aortic endothelial cells. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. v. 4, p. 2256-2261. 2006.

RYDER, M.I. Comparison of neutrophil functions in aggressive and chronic periodontitis. *Periodontology 2000*. v. 53, p. 124-137. 2010.

SAABER, D.; et al. Recent progress in tight junction modulation for improving bioavailability. *Expert Opinion on Drug Discovery*. v. 9, n. 4, p. 367-381. 2014.

SADEGHI, H.; et al. Further studies on anti-inflammatory activity of maprotiline in carrageenan-induced paw edema in rat. *International Immunopharmacology*. v. 15, n. 3, p. 505-510. 2013.

SAFFI, M.A.; et al. Relationship between vascular endothelium and periodontal disease in atherosclerotic lesions: review article. *World Journal of Cardiology*. v. 7, n. 1, p. 26-30. 2015.

SAINZ, I.M.; et al. Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. v. 98, n. 1, p. 77-83. 2007.

SAKAT, S.S.; et al. Release-active dilutions on diclofenac enhance anti-inflammatory effect of diclofenac in carrageenan-induced rat paw edema model. *Inflammation*. v. 10, n. 1007, p. 1-9. 2013.

SATO, E.; et al. Bradykinin stimulates alveolar macrophages to release neutrophil, monocyte, and eosinophil chemotactic activity. *Journal of Immunology*. v. 157, n. 7, p. 3122-3129. 1996.

SAXENA, P.; et al. Kallikrein-kinin system: a surgical perspective in post-aprotinin era. *Journal of Surgical Research*. v. 167, n. 1, p. 70-77. 2011.

SCHANSTRA, J.P.; et al. The B₁-agonist [des-Arg¹⁰]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B₁-receptor in cultured human lung fibroblasts. *Journal of Clinical Investigation*. v. 101, n. 10, p. 2080-2091. 1998.

SCHANSTRA, J.P.; et al. Homologous and heterologous induction of the human bradykinin B₁-receptor and B₁-receptor localization along the rat nephron. *Immunopharmacology*. v. 45, n. 1-3, p. 29-34. 1999.

SCHENKEIN, H.A.; LOOS, B.G. Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. *Journal of Periodontology*. v. 84, n. 4, Suppl, p. S51-69. 2013.

SCOTT, C.F.; et al. Purification and characterization of a potent 70-kDa thiol lysyl-proteinase (lys-gingipain) from *Porphyromonas gingivalis* that cleaves kininogens and fibrinogen. *Journal of Biological Chemistry*. v. 268, n. 11, p. 7935-7942. 1992.

SELWYN, B.M.; et al. A tissue kallikrein in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Annals of Rheumatic Diseases*. v. 48, p. 128-133. 1989.

SHAJIB, M.S.; KHAN, W.I. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiologica*. v. 213, n. 3, p. 561-574. 2015.

SHARMA, J.N.; et al. Blood pressure regulation by the kallikrein-kinin system. *General Pharmacology*. v. 27, n. 1, p. 55-63. 1996.

SHARMA, J.N. Role of tissue kallikrein-kininogen-kinin pathways in the cardiovascular system. *Archives of Medical Research*. v. 37, n. 3, p. 299-306. 2006.

SHARMA, J.N. Role of tissue kallikrein-kininogen-kinin pathways in the cardiovascular system. *Archives of Medical Research*. v. 37, n. 3, p. 299-306. 2006.

SHARMA, J.N.; AL-SHERIF, G.J. Pharmacology targets and prototype therapeutics in the kallikrein-kinin system: bradykinin receptor agonists or antagonists. *The Scientific World Journal*. v. 6, p. 1247-1261. 2006.

SHEIRH, I.A.; KAPLAN, A.P. Studies of the digestion of bradykinin, lysyl bradykinin, and kinin-degradation products by carboxypeptidases A, B and N. *Biochemical Pharmacology*. v. 35, n. 12, p. 1957-1963. 1986.

SHEJAWAL; N.; MENON, S.; SHAILAJAN, S. A simple, sensitive and accurate method for rat paw volume measurement and its expediency in preclinical animal studies. *Human and Experimental Toxicology*. v. 45, n. 12, p. 1-8. 2013.

SMITH, C.; CAMPBELL, S.; ALBANO, J. Urinary kallikrein excretion in normotensive and hypertensive pregnancies: 8 years later. *Immunopharmacology*. v. 44, n. 1-2, p. 177-182. 1990.

SOARES DE MOURA, R.; et al. The role of bradykinin, AT₂ and angiotensin 1-7 receptors in the EDRF-dependent vasodilator effect of angiotensin II on the isolated

mesenteric vascular bed of the rat. *British Journal of Pharmacology*. v. 141, n. 5, p. 860-866. 2004.

SODER, P.; et al. Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in blood as markers for early atherosclerosis in subjects with chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*. v. 44, p. 452-458. 2009.

SOJAR, H.T.; et al. Purification and characterization of a protease from *Porphyromonas gingivalis* capable of degrading salt-solubilized collagen. *Infection and Immunity*. v. 61, n. 6, p. 2369-2376. 1993.

SOUZA, D.M.; et al. Evaluation of two morphometric methods of bone loss percentages caused by periodontitis in rats in different locations. *Journal of Applied Oral Science*. v. 18, n. 5, p. 493-497. 2010.

SQUIRE, I.B.; et al. Bradykinin B₂ receptor antagonism attenuates blood pressure response to acute angiotensin-converting enzyme inhibition in normal men. *Hypertension*. v. 36, n. 1, p. 132-136. 2000.

STONE, O.A.; et al. Critical role of tissue kallikrein in vessel formation and maturation: implications for therapeutic revascularization. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology*. v. 29, n. 5, p. 657-664. 2009.

STRUILLLOU, X.; et al. Experimental animal models in periodontology: a review. *Open Dentistry Journal*. v. 29, n. 4, p. 37-47. 2010.

SUKUKI, K.; et al. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Analytical Biochemistry*. v. 132, n. 2, p. 345-352. 1983.

TAKEUCHI, H.; et al. The serine phosphatase SerB of *Porphyromonas gingivalis* suppresses IL-8 production by dephosphorylation of NF- κ B RelA/p65. *Plos One*. v. 2013.

TONETTI, M.S.; et al. Treatment of periodontitis and endothelial function. *New England Journal of Medicine*. v. 356, p. 911-920. 2007.

TSCHOPE, C.; HERINGER-WALTHER, S.; WALTHER, T. Regulation of the kinin receptors after induction of myocardial infarction: a mini-review. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 33, n. 6, p. 701-708. 2000.

TSUKAGOSHI, J.P.; et al. Regulation by interleukin-1-beta of gene expression of bradykinin B₁-receptor in MH-S murine alveolar macrophage cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 259, n. 2, p. 476-482. 1999.

TU, Y.K.; et al. Associations between tooth loss and mortality patterns in the Glasgow Alimni Cohort. *Heart*. v. 93, p. 1098-1103. 2007.

TURNER, P.; et al. Role of kinins in seasonal allergic rhinitis: icatibant, a bradykinin B₂ receptor antagonist, abolishes the hyperresponsiveness and nasal eosinophilia induced by antigen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v. 107, n. 1, p. 105-113. 2001.

- VARDAR-SENGUL, S.; et al. Dietary supplementation of omega-3 fatty acid and circulating levels of interleukin-1 β , osteocalcin, and c-reactive protein in rats. *Journal of Periodontology*. v. 77, n. 5, p. 814-820. 2006.
- VIANNA, R.M.J.; CALIXTO, J.B. Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-arg⁹-BK in mouse pleurisy. *British Journal of Pharmacology*. v. 123, n. 2, p. 281-291. 1998.
- WANG, G.P. Defining functional signatures of dysbiosis in periodontitis progression. *Genome Medicine*. v. 7, n. 40, p. 1-3. 2015.
- WEDMORE, CV.; WILLIAMS, T.J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. *Nature*. v. 289, n. 5799, p. 646-650. 1981.
- WINGROVE, J.A.; et al. Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas (Bacterioides) gingivalis*. *Journal of Biological Chemistry*. v. 267, p. 18902-18907. 1992.
- WINTER, C.A.; RISLET, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. v. 111, p. 544-547. 1962.
- WITHEROU, F.N.; et al. Bradykinin contributes to the vasodilator effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with heart failure. *Circulation*. v. 104, n. 4, p. 2177-2181. 2001.
- WOJCIAK-STOCHARD, B.; RIDLEY, A.J. Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascular Pharmacology*. v. 39, n. 3-4, p. 187-199. 2002.
- YANG, X.P.; et al. Diminished cardioprotective response to inhibition of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor in B₂ kinin receptor gene knockout mice. *Circulation Research*. v. 88, n. 10, p. 1072-1079. 2001.
- ZANG, D.; et al. Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1 β , TNF α and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate Immunity*. v. 4, n. 2, p. 99-107. 2008.
- ZAUSINGER, S. Bradykinin receptor antagonists in cerebral ischemia and trauma. *IDrugs*. v. 6, n. 10, p. 970-975. 2003.
- ZENOBI, C.; HAJISHENGALLIS, G. *Porphyromonas gingivalis* virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence*. V. 6, n. 3, p. 236-243. 2015.
- ZHANG, X.; et al. Carboxypeptidase M is a positive allosteric modulator of the kinin B1 receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 288, n. 46, p. 33226-33240. 2013.

ZHOU, X.; POLGAR, P.; TAYLOR, L. Roles for interleukin-1-beta, phorbol esters and a post-transcriptional regulator in the control of bradykinin B₁ receptor gene expression. *Biochemical Journal*. v. 330, n. 1, p. 361-366. 1998.

ANEXO A

9 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 – 005/2015

Protocolo UEPG – 21548/2014

Título – “Avaliação do envolvimento dos receptores B_1 e B_2 para cininas nas alterações inflamatórias e cardiovasculares sistêmicas induzidas pela periodontite”.

Data de Entrada – 09/12/2014

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 09/12/2014 a 09/12/2016

Considerações

Prezado Professor Daniel Fernandes:

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, a utilização de 80 (oitenta) *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, machos com 90 dias de idade.

Situação: APROVADO.

Ponta Grossa, 09 de abril de 2015.

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROESP - CEUA - Comissão de Ética do Uso de Animal

Prof. Dra. Maria Marta Laddi
Coordenadora