

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

LUIZ RENATO OLCHANHESKI JUNIOR

**ESTUDO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDAS NA
VASODILATAÇÃO DEPENDENTE DE ENDOTÉLIO DURANTE A PERIODONTITE
EXPERIMENTAL**

PONTA GROSSA

2014

LUIZ RENATO OLCHANHESKI JUNIOR

**ESTUDO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDAS NA
VASODILATAÇÃO DEPENDENTE DE ENDOTÉLIO DURANTE A PERIODONTITE
EXPERIMENTAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio André Santos

PONTA GROSSA

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

042 Olchanheski Junior, Luiz Renato

Estudo das vias de sinalização celular envolvidas na vasodilatação dependente de endotélio durante a periodontite experimental/ Luiz Renato Olchanheski Junior. Ponta Grossa, 2014.
61f.

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

Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes.
Co-Orientador: Prof. Dr. Fábio André Santos Santos.

1.Periodontite. 2.Disfunção endotelial. 3.Vasodilatação. I.Fernandes, Daniel. II. Santos, Fábio André Santos. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 617.632



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Ata nº. 01/2014

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO, DO PÓS-GRADUANDO LUIZ RENATO OLCANHESKI JUNIOR,, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, REALIZADA NO DIA 18 DE FEVEREIRO DE 2014, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao décimo oitavo dia do mês de fevereiro de dois mil e quatorze, às 08h30min h, na Sala M 122 da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Prof. Dr. Fábio André dos Santos, em sessão fechada, reuniu-se a banca examinadora para a defesa de dissertação do pós-graduando Luiz Renato Olchanheski Junior. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia. Linha de Pesquisa: Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fisiopatológicos. A banca foi constituída pelos pesquisadores: Prof. Dr. Fábio André dos Santos (Presidente) / UEPG, Profa. Dra. Sandra Crestani / UFSC e Prof. Dr. Giovani Marino Fávero / UEPG, indicados pelo egrégio colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – nível de Mestrado Acadêmico, desta Universidade, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e o candidato das normas que regem a defesa de dissertação e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. O trabalho analisado foi “**Estudo das vias de sinalização celular envolvidas na vasodilatação dependente de endotélio durante a periodontite experimental**”. Encerrada a defesa de dissertação, procedeu-se o julgamento, tendo sido o candidato APROVADO. Foi dada ciência ao mestrando que, de acordo com o Art. 34 do Regulamento do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - UNICENTRO/UEPG, *para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, o aluno tem o prazo de 30 (trinta) dias após esta defesa para entregar as cópias da versão definitiva, que devem ser aprovadas pelo orientador e homologadas pelo Colegiado de curso.* Nada mais havendo a tratar, lavrou-se à presente ata que vai assinada pelos membros da banca examinadora e por mim, Renata Carneiro, Renata Carneiro, secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela UEPG. Ponta Grossa, 18 de fevereiro de 2014.

Observação (se necessária):

Prof. Dr. Fábio André dos Santos

Profa. Dra. Sandra Crestani

Prof. Dr. Giovani Marino Fávero

“O que você sabe não tem valor, o valor está no que você faz com o que sabe.”

Bruce Lee

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que iluminou meus caminhos e me apontou as melhores escolhas.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À CAPES pela bolsa fornecida e à Fundação Araucária e ao CNPq pelo fomento na compra de reagentes e equipamentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Fernandes, por toda paciência, pela amizade, conselhos e atenção.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Fábio André dos Santos e ao programa de Pós Graduação em Odontologia, por abrirem as portas do Laboratório.

Ao coordenador do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas Prof. Dr. Paulo Vitor Farago por todo o empenho e dedicação ao PPGCF.

Às Funcionárias do Biotério Marilene e Maria, pelos cuidados com os animais, pela amizade e por toda atenção.

Aos meus companheiros de laboratório Lorena Christine Wiecheteck de Brito, Reila Tainá Mendes, Willian Moreira Machado, Vanessa Kovalski, Letícia Antonelo Campos e Ana Paula Prestes.

À minha mãe Cleunice Vieira de França e ao meu irmão Luiz Ricardo Olchanheski pelo constante apoio.

À minha namorada Ragna Woeltje Tavares, pelo companheirismo e até mesmo auxílio durante meus experimentos.

RESUMO

A periodontite é definida como uma doença caracterizada pela formação de um biofilme dental, que favorece a colonização de microrganismos que iniciam um processo inflamatório local. Este processo inflamatório não fica restrito a cavidade bucal, ele ganha a circulação causando efeitos sistêmicos, como a disfunção endotelial. A disfunção é caracterizada principalmente pela redução da produção e biodisponibilidade de óxido nítrico, predispondo o indivíduo a um aumento no risco de doenças cardiovasculares. Trabalhos recentes mostram que animais com periodontite experimental apresentam uma disfunção endotelial quatorze dias após a indução da periodontite, porém, esta redução da resposta vasodilatadora não é evidente vinte e um dias após o mesmo procedimento. A proposta do presente trabalho foi avaliar um possível aumento de mecanismos compensatórios de vasodilatação em animais com periodontite experimental. Para isso, os ratos receberam as ligaduras para indução da periodontite, ou passaram pela falsa-cirurgia. Vinte e um dias após o procedimento, todos os animais passaram pela administração intravenosa de três doses crescentes de acetilcolina e nitroprussiato de sódio. Em seguida, os animais receberam as seguintes administrações: LNAME (inibidor da NOS) + indometacina (inibidor da COX) + TEA (inibidor não seletivo dos canais de potássio), ou LNAME, ou indometacina, ou TEA, ou administração de indometacina + TEA ou Apamina (inibidor seletivo dos SK_{Ca}) + TRAM-34 (inibidor seletivo dos IK_{Ca}). Após um período de 20 minutos, todos os grupos passaram por uma nova administração dos dois agentes vasodilatadores. Vinte e um dias após a indução da periodontite, os animais, não apresentaram disfunção, e a inibição de NOS, COX e a utilização de um inibidor não seletivo dos canais de potássio, evidenciou uma alteração no tempo de vasodilatação do grupo ligadura. A combinação dos demais inibidores não resultou em alterações significativas. A administração de inibidores de SK_{Ca} e IK_{Ca} resultou em uma diminuição do tempo da resposta vasodilatadora dependente de endotélio, demonstrando a importância destes canais no mecanismo de compensação vasodilatadora 21 dias após a indução da doença periodontal.

Palavras-chave: Periodontite, disfunção endotelial, vasodilatação

ABSTRACT

Periodontitis is defined as a disease characterized by the formation of a biofilm which promotes colonization of microorganisms responsible for the initiation of a local inflammatory process. Studies have shown that the inflammatory process is not restricted to the oral cavity, reaching the circulation and causing systemic effects, such as endothelial dysfunction. The dysfunction is mainly characterized by reduced nitric oxide production/ bioavailability which increased platelet aggregation, leukocyte adhesion and rolling, and result in a loss in the ability of vasodilation. Therefore predisposing to an increased risk of cardiovascular disease. According to research by our group, animals with experimental periodontitis showed a decrease in endothelium-dependent vasodilator response fourteen days after the induction of periodontitis, however, this reduced vasodilator response is not evident twenty one days. The purpose of this study was to evaluate a possible increase in compensatory mechanisms of vasodilation in animals with experimental periodontitis. For this, rats received ligatures for induction of periodontitis, or were sham. Twenty one days after the procedure, the animals were prepared for blood pressure recording. Two consecutive dose-response curves to acetylcholine and sodium nitroprusside were obtained before and 20 min after LNAME (NOS inhibitor) + indometacin (COX inhibitor) + TEA (selective inhibitor of potassium channels) or LNAME or indometacin, or TEA or indometacin + TEA or Apamin + TRAM-34 injection. Only the selective and simultaneous blockade of small and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels by selective inhibitors (Apamin and TRAM-34, respectively) was able to reduce acetylcholine-induced reduction on blood pressure at periodontitis animals. The inhibition of NOS, COX and use of a non-selective inhibitor of potassium channels, did not change the endothelium-depended vasodilatation. Altogether, these results show that IKca and SKca may balance the endothelial function and therefore mask the impairment on NO production and endothelial dysfunction.

Key words: periodontitis, endothelial dysfunction, vasodilation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da reabsorção óssea presente na periodontite.....	15
Figura 2 – Relação entre periodontite e doenças cardiovasculares.....	17
Figura 3 – Síntese e função do óxido nítrico (NO) na musculatura lisa vascular.....	18
Figura 4 – Representação esquemática da ferramenta farmacológica utilizada na avaliação da disfunção endotelial.....	19
Figura 5 – Mecanismo de relaxamento da musculatura lisa vascular.....	22
Figura 6 – Representação esquemática dos objetivos centrais do trabalho.....	24
Figura 7 – Colocação das ligaduras nos ratos.....	27
Figura 8 – Mandíbula corada pronta para avaliação da perda óssea.....	28
Figura 9 – Representação esquemática do procedimento de avaliação do parâmetro cardiovascular e administração dos reagentes.....	29
Figura 10 – Registro típico dos agentes vasodilatadores Ach e SNP.....	32
Figura 11 – Representação cronológica para avaliação dos parâmetros cardiovasculares e avaliação da perda óssea alveolar.....	33
Figura 12 – Perda óssea alveolar induzida pela colocação de ligaduras.....	35
Figura 13 – Avaliação temporal da função endotelial de ratos submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.....	36
Figura 14 – Representação da avaliação dos parâmetros cardiovasculares antes e depois da administração de LNAME, Indometacina e TEA.....	37
Figura 15 – Representação da avaliação dos parâmetros cardiovasculares antes e depois da administração de LNAME.....	39

Figura 16 – Representação da avaliação dos parâmetros cardiovasculares antes e depois da administração de indometacina.....	40
Figura 17 – Representação da avaliação dos parâmetros cardiovasculares antes e depois da administração de TEA.....	41
Figura 18 – Representação da avaliação dos parâmetros cardiovasculares antes e depois da administração de Apamina e TRAM-34.....	42
Figura 19 – Representação da avaliação dos parâmetros cardiovasculares antes e depois da administração de Indometacina e TEA.....	44
Figura 20 – Representação da avaliação pressão arterial basal antes e depois da administração de LNAME, Indometacina e/ou TEA.	45
Figura 21 – Cronologia das alterações causadas pela indução da periodontite observadas pelo nosso grupo de trabalho.....	51

TABELA

Tabela 1 – Bloqueadores das 3 subfamílias dos K_{Ca}	23
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
Ach	Acetilcolina
ATP	Adenosina trifosfato
BK _{Ca}	Canais de potássio de larga condutância sensíveis ao cálcio
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX	Cicloxygenase
COX – 1	Cicloxygenase 1
DBCA	Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização e Animais para fins Científicos e Didáticos
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
COX – 2	Cicloxygenase 2
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
GTP	Trifosfato de guanosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-11	Interleucina 11
IK _{Ca}	Canais de potássio de condutância intermediária sensíveis ao cálcio
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
K _{ATP}	Canais de potássio sensíveis ao ATP

K _{Ca}	Canais de potássio sensíveis ao cálcio
K _{ir}	Canal de potássio retificador de influxo
K _v	Canais de potássio sensíveis à voltagem
LNAME	N-ω-nitro-L-arginina metil éster
LPS	Lipopolissacarídeo
MaxiK	Canais de potássio de larga condutância
nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
NOS-1	Óxido nítrico sintetase neuronal
NOS-2	Óxido nítrico sintetase induzida
NOS-3	Óxido nítrico sintetase endotelial
OPG	Osteoprotegerina
PCR	Proteína C Reativa
PE	Polietileno
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostacilina I ₂ (Prostaciclina)
RANK	Receptor de ativação nuclear kappa B
RANKL	Ligante do receptor de ativação nuclear kappa B
SK _{Ca}	Canais de potássio de baixa condutância sensíveis ao cálcio
SNP	Nitroprussiato de sódio
TEA	Tetraetilamônio
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVOS GERAIS	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 ANIMAIS	26
3.2 PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA	26
3.3 AVALIAÇÃO DA PERDA ÓSSEA: MORFOMÉTRICO	27
3.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES	28
4. COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS	29
5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	30
5.1 PROTOCOLO 1	30
5.2 PROTOCOLO 2	31
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
7. RESULTADOS	34
7.1 PERDA ÓSSEA ALVEOLAR	34
7.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES	35
7.2.1 AVALIAÇÃO TEMPORAL DA FUNÇÃO ENDOTELIAL	35
7.2.2 BLOQUEIO SIMULTÂNEO DA NOS, COX E CANAIS DE POTÁSSIO	37
7.2.3 BLOQUEIO DA NOS	38
7.2.4 BLOQUEIO DA COX	39

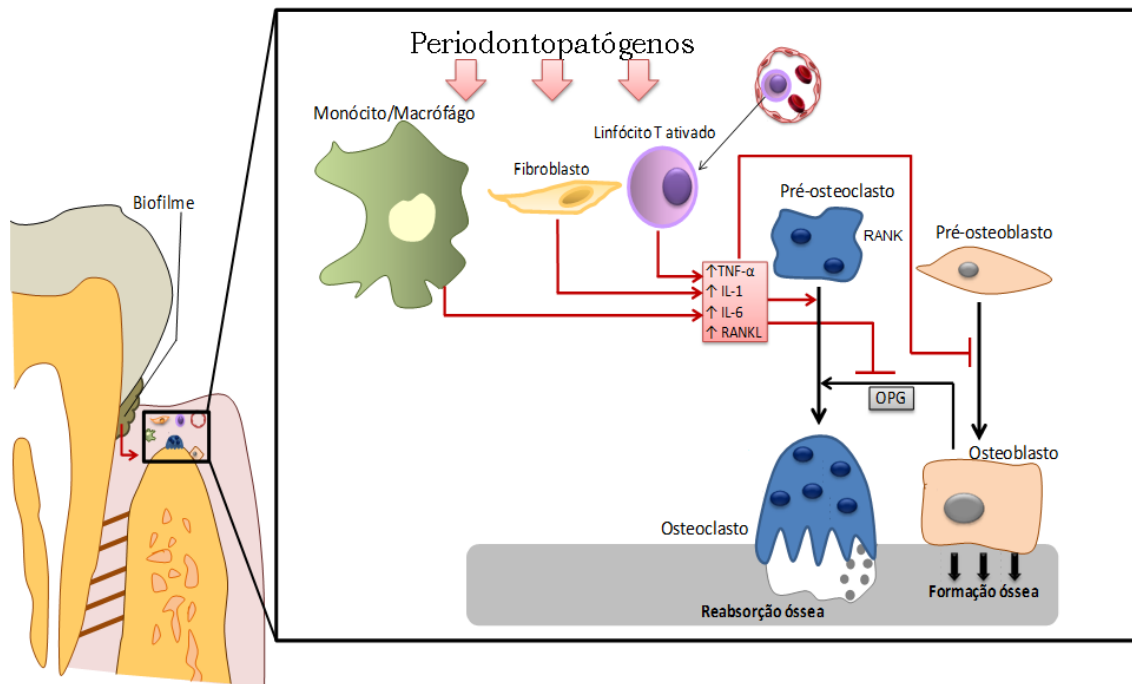
7.2.5	BLOQUEIO DOS CANAIS DE POTÁSSIO.....	41
7.2.5.1	BLOQUEIO NÃO SELETIVO DOS CANAIS DE POTÁSSIO.....	41
7.2.5.2	BLOQUEIO SELETIVO DOS CANAIS DE POTÁSSIO.....	42
7.2.6	BLOQUEIO SIMULTÂNEO DA COX E DOS CANAIS DE POTÁSSIO.....	43
7.2.7	PRESSÃO BASAL ANTES E APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE LNAME, INDOMETACINA E/OU TEA.....	44
8.	DISCUSSÃO.....	46
9.	REFERÊNCIAS.....	53
10.	ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UEPG.....	61

1. INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica de origem bacteriana e relacionada principalmente com microrganismos anaeróbicos gram-negativos que colonizam a área subgengival. (BELIBASAKIS, et al., 2011). Alguns fatores podem favorecer o desenvolvimento da periodontite, tais como uma higiene bucal precária, tabagismo, predisposição genética e diabetes (RENVERT e PERSSON, 2002). As principais características da periodontite são a destruição do tecido periodontal de inserção, infiltração de leucócitos, formação de bolsa periodontal e reabsorção óssea (TSIOUFIS, et al., 2011).

A presença de microrganismos no biofilme dental subgengival inicia uma resposta inflamatória caracterizada pela migração de leucócitos para a região onde estão presentes tais microrganismos. Os leucócitos presentes no infiltrado inflamatório liberam citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 11 (IL-11), e fator de necrose tumoral (TNF α) (LOOS et al., 2001; NAGASAWA, et al., 2007; COTTI et al., 2011). Estes mediadores inflamatórios além de perpetuarem a inflamação ativam os osteoclastos, células mielóides multinucleadas especializadas em degradar a matriz óssea mineralizada. Os osteoclastos são considerados os principais responsáveis pela perda óssea alveolar e pelo acometimento do ligamento periodontal, característicos da periodontite (BARTOLD, et al., 2010; PAIZAN; MARTIN, 2009). Os osteoblastos possuem um fator que controla a diferenciação dos osteoclastos, denominado RANKL (*receptor activator of nuclear factor NF- κ B ligant*). A liberação de citocinas pró-inflamatórias, citada anteriormente, causa a ativação de RANKL, que se liga ao seu receptor RANK, presente na membrana de osteoclastos imaturos, estimulando desta maneira, a osteoclastogênese (Figura 1) (BOYLE et. al., 2003; NAGASAWA, et al., 2007). A ativação de RANKL é dependente da expressão de OPG (osteoprotegerina), inibidora natural de RANKL. A OPG é uma proteína solúvel, produzida pelos osteoblastos, que se liga com alta afinidade ao RANKL, impedindo que este se ligue ao seu receptor RANK. Dependendo da quantidade de mediadores inflamatórios presente no tecido gengival associada a fatores externos predisponentes – como má higiene bucal bem como o não tratamento da doença – esta reabsorção óssea pode levar a perda de elementos dentários (NAGASAWA, et al., 2007; COCHRAN, 2008).

Figura 1: Representação esquemática da reabsorção óssea presente na periodontite.

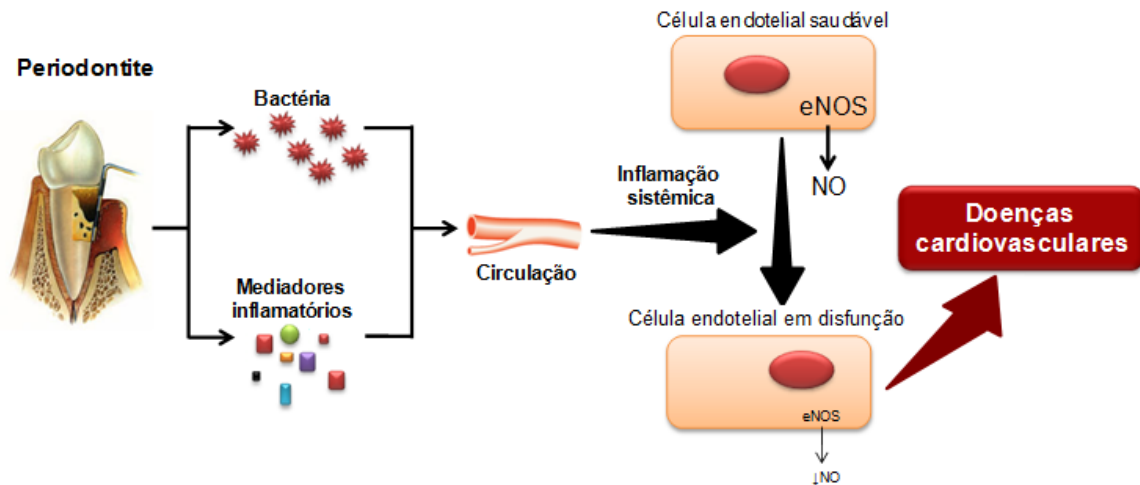


O acúmulo de biofilme com presença de patógenos periodontais no espaço subgengival produz um processo inflamatório que conduz a reabsorção óssea e a perda do tecido de suporte dentário. A liberação de componentes das bactérias gram-negativas, tais como lipopolissacarídeo (LPS), gera a ativação e a migração de linfócitos, e ativação de fibroblastos já presentes no tecido gengival. Estas células passam a produzir mediadores inflamatórios (IL-6, IL-1, TNF- α , RANKL) que estimulam a ativação de osteoclastos e favorecem a osteoclastogênese. Dentre essas citocinas, merece destaque a RANKL, que ligada com seu receptor RANK, presente na membrana de osteoclastos imaturos, promove a diferenciação dos mesmos em células maduras. A perda óssea ocorre principalmente através da produção excessiva de uma forma solúvel de RANKL por linfócitos. Uma maior produção de RANKL, portanto, resulta em uma maior diferenciação osteoclástica. Os mediadores inflamatórios também são capazes de inibir a formação de novos osteoblastos, bem como reduzir a produção de OPG. A OPG é uma proteína solúvel, produzida pelos osteoblastos, que se liga com alta afinidade ao RANKL, impedindo que este se ligue ao seu receptor RANK. Todo este processo resulta em um aumento da reabsorção óssea local.

Vários estudos têm relacionado a periodontite com alterações sistêmicas, como diabetes e obesidade (HAYNES e STANFORD, 2003; OLTEANU et al., 2011). Estudos observacionais (TONETTI et al., 2007; HIGASHI et al., 2008), e contínuas meta-análises (JANKET et al., 2003; KHADER et al., 2004; BAHEKAR et al., 2007) têm mostrado um significativo aumento do risco de doenças cardiovasculares,

principalmente aterosclerose e hipertensão, entre indivíduos com doença periodontal (TSIOUFIS et al., 2011). O mecanismo pelo qual a periodontite é relacionada com doenças cardiovasculares não é muito claro, mas acredita-se que o processo inflamatório presente na periodontite não fica restrito à cavidade bucal, ele ganha a circulação sistêmica causando várias alterações (Figura 2), como por exemplo, uma inflamação vascular (HAYNES e STANFORD, 2003). O LPS bacteriano lançado na circulação aumenta a expressão de moléculas de adesão e estimula a síntese de citocinas pró-inflamatórias, estimulando a adesão de leucócitos e o recrutamento e migração de células inflamatórias (OHTA et al., 2005). Durante este processo, a presença de neutrófilos gera a produção de espécies reativas de oxigênio, resultando na disfunção endotelial (TSIOUFIS, et al., 2011). Suportando esta ideia, foi demonstrada que a dilatação dependente de endotélio da artéria braquial está diminuída em pacientes com doença periodontal severa, situação que foi associada a altos níveis de marcadores inflamatórios sistêmicos como a Proteína C Reativa (PCR) (AMAR et al., 2003; MERCANOGLU et al., 2004). A redução na vasodilatação dependente de endotélio caracteriza o quadro de disfunção endotelial, atualmente considerado a primeira etapa para desenvolvimento de doenças cardiovasculares como hipertensão e aterosclerose (SITIA et al., 2010). Sucessivos trabalhos tem confirmado a presença da disfunção endotelial em paciente com periodontite (AMAR et al., 2003; TONETI et al., 2007; HIGASHI et al., 2008, HIGASHI et al., 2009). Considerando que as células endoteliais cobrem a árvore vascular de todos os órgãos e são as primeiras células a entrar em contato com bactérias e produtos bacterianos disseminados na corrente sanguínea, é fácil compreender que estas células serão afetadas por um processo infeccioso sistêmico.

Figura 2: **Relação entre periodontite e doenças cardiovasculares.**

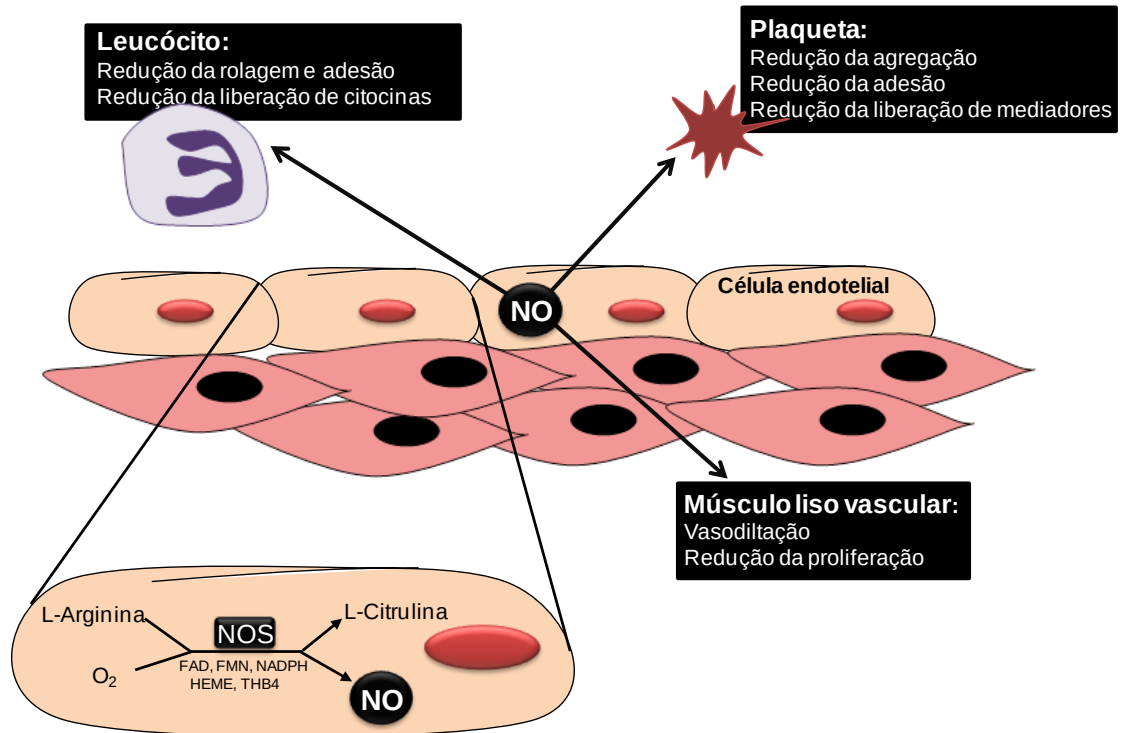


A presença dos microrganismos irá induzir uma resposta inflamatória local. Este processo inflamatório não fica restrito na cavidade bucal, ele ganha a circulação causando uma inflamação sistêmica. Esta inflamação promove uma diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico, levando à complicações cardiovasculares.

Para manter a homeostasia, as células endoteliais produzem componentes da matriz extracelular, como o colágeno e uma grande variedade de mediadores químicos regulatórios, como por exemplo, óxido nítrico (NO), prostaciclina, endotelina 1 e angiotensina II (QUYYUMI, 1998). Em condições fisiológicas há um balanço entre fatores relaxantes, como o NO e fatores constritores como a endotelina 1. Na disfunção endotelial a biodisponibilidade do NO é reduzida e este balanço é alterado, predispondo a complicações cardiovasculares (TAN et al., 2002). O NO é produzido na célula endotelial vascular a partir do aminoácido L-arginina em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) (Figura 3). Existem pelo menos três isoformas de NOS, cada uma sendo produto de um gene distinto. A NOS neuronal (nNOS ou NOS-1), a NOS induzida (iNOS ou NOS-2) e a NOS endotelial (eNOS ou NOS-3) (SALVEMINI et al., 2013). Além da clássica ação vasodilatadora, o NO previne liberação de citocinas de leucócitos, bem como previne sua adesão, migração na parede vascular, proliferação de células do músculo liso, agregação e adesão de plaquetas (ANDRUKHOV et al., 2013) (Figura 3). Portanto, a redução na produção de óxido nítrico pode gerar complicações causando um desbalanço na fisiologia vascular predispondo desta maneira o indivíduo à complicações cardiovasculares (TAN et al., 2002). Desta forma, o

endotélio, outrora considerado uma simples barreira com permeabilidade seletiva entre o sangue e outras paredes vasculares, é agora reconhecido como um órgão homeostático crucial, fundamental para regulação do tônus e da estrutura vascular (VERSARI et al., 2009).

Figura 3: Síntese e função do óxido nítrico (NO) na musculatura lisa vascular.

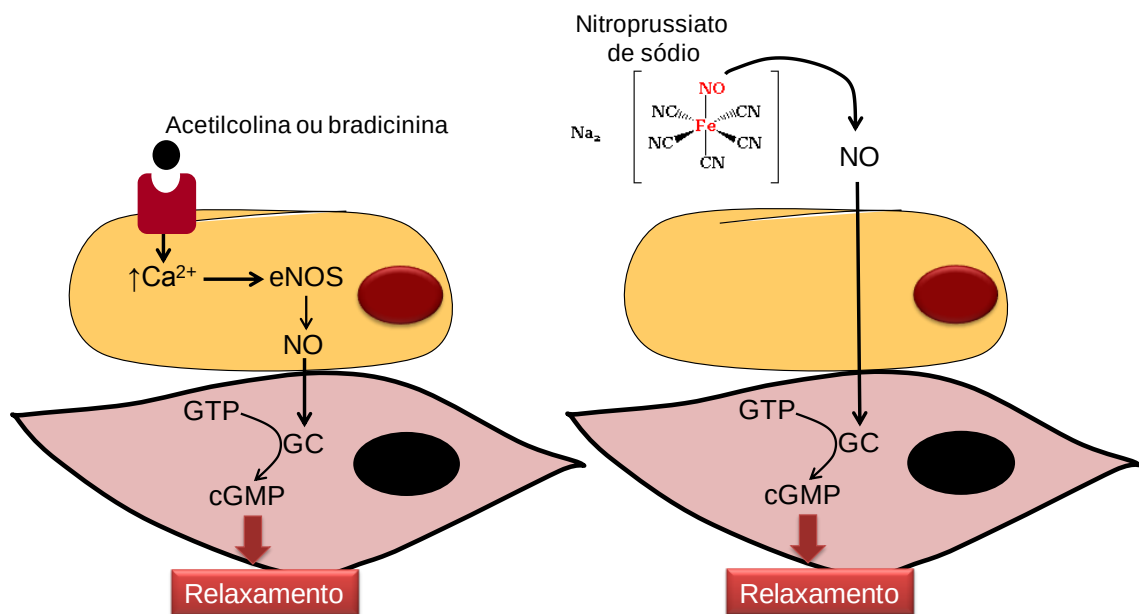


O NO é produzido na célula endotelial a partir do aminoácido L-arginina em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Além da clássica ação vasodilatadora, o NO previne liberação de citocinas de leucócitos, previne a adesão leucocitária, a migração destas células na parede vascular,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

A função endotelial é comumente avaliada por meio de uma ferramenta farmacológica que consiste na administração de dois diferentes vasodilatadores, um dependente (acetilcolina ou bradicinina) e outro independente de endotélio (nitroprussiato de sódio) (HIGASHI et al., 2008; HIGASHI et al., 2009; NG et al, 2011). A acetilcolina e a bradicinina, através da ativação de receptores de membrana, geram um aumento na concentração de cálcio citoplasmático gerando ativação da eNOS, e consequente produção de óxido nítrico. O NO se difunde até a célula de músculo liso ativando a enzima guanilato ciclase e aumentando a produção de cGMP (TAKIMOTO, 2012) que por sua vez modula uma série de

mecanismos celulares gerando relaxamento da célula de músculo liso (Figura 4). Por outro lado, o nitroprussiato é um agente vasodilatador que libera NO espontaneamente, atuando diretamente no músculo liso (Figura 4). Desta forma, através da utilização conjunta destes compostos é possível avaliar a funcionalidade do endotélio. Esta ferramenta é amplamente utilizada para avaliação da função endotelial (FUJIWARA, et al., 2012; MECANOGLU, et al., 2004). Na disfunção endotelial é observada uma diminuição da resposta vasodilatadora dependente de endotélio, mas a resposta vasodilatadora independente de endotélio se mantém intacta, uma vez que o músculo liso não apresenta alterações.

Figura 4: **Representação esquemática da ferramenta farmacológica utilizada na avaliação da disfunção endotelial.**



A função endotelial é realizada através da utilização de uma ferramenta farmacológica que consiste na utilização de dois agentes vasodilatadores: a acetilcolina (vasodilatador dependente de endotélio) e o nitroprussiato de sódio (vasodilatador independente de endotélio). Para causar uma vasodilatação, a acetilcolina ativa receptores presentes na membrana da célula endotelial. Essa ativação causa a liberação de NO, que atua de forma parácrina na enzima guanilato ciclase, presente na célula do músculo liso vascular adjacente, resultando no relaxamento do vaso. Ou seja, para a acetilcolina causar uma vasodilatação, o endotélio necessita estar íntegro, sem deficiência na biodisponibilidade de NO. O nitroprussiato é um fármaco que libera NO atuando como um doador de óxido nítrico, causando uma vasodilatação de maneira independente do endotélio. Na disfunção endotelial é observada uma diminuição da resposta vasodilatadora dependente de endotélio, mas a resposta vasodilatadora independente de endotélio se mantém intacta.

Como citado anteriormente, vários trabalhos tem mostrado a presença de inflamação sistêmica e disfunção endotelial em pacientes com periodontite (ANDRUKHOV et al., 2013). Recentemente, o nosso grupo demonstrou a presença de inflamação vascular e disfunção endotelial em um modelo experimental de periodontite em ratos (BRITO et al., 2013; MACHADO et al., 2014). Estes dados concordam com os resultados obtidos com pacientes, entretanto, esta disfunção observada nos animais foi transitória, não sendo notada em períodos mais tardios do processo (BRITO et al., 2013; MENDES et al., 2014). A partir destes dados é possível especular que a inflamação vascular no endotélio se resolveu. Entretanto, estes mesmos trabalhos mostram que apesar da resposta vasodilatadora estar normalizada, o endotélio continua inflamado e a produção de NO comprometida (BRITO et al., 2013; MENDES et al., 2014). Esta restauração da resposta vasodilatadora dependente de endotélio associada à manutenção da inflamação na célula endotelial, apontam para uma possível compensação da vasodilatação por outras vias de sinalização celular e que são independentes do óxido nítrico. O possível envolvimento destas vias na vasodilatação dependente de endotélio pode mascarar a presença de disfunção endotelial, já que o diagnóstico é geralmente feito através de avaliação funcional do endotélio (POREDOS e JEZOVNIK, 2013).

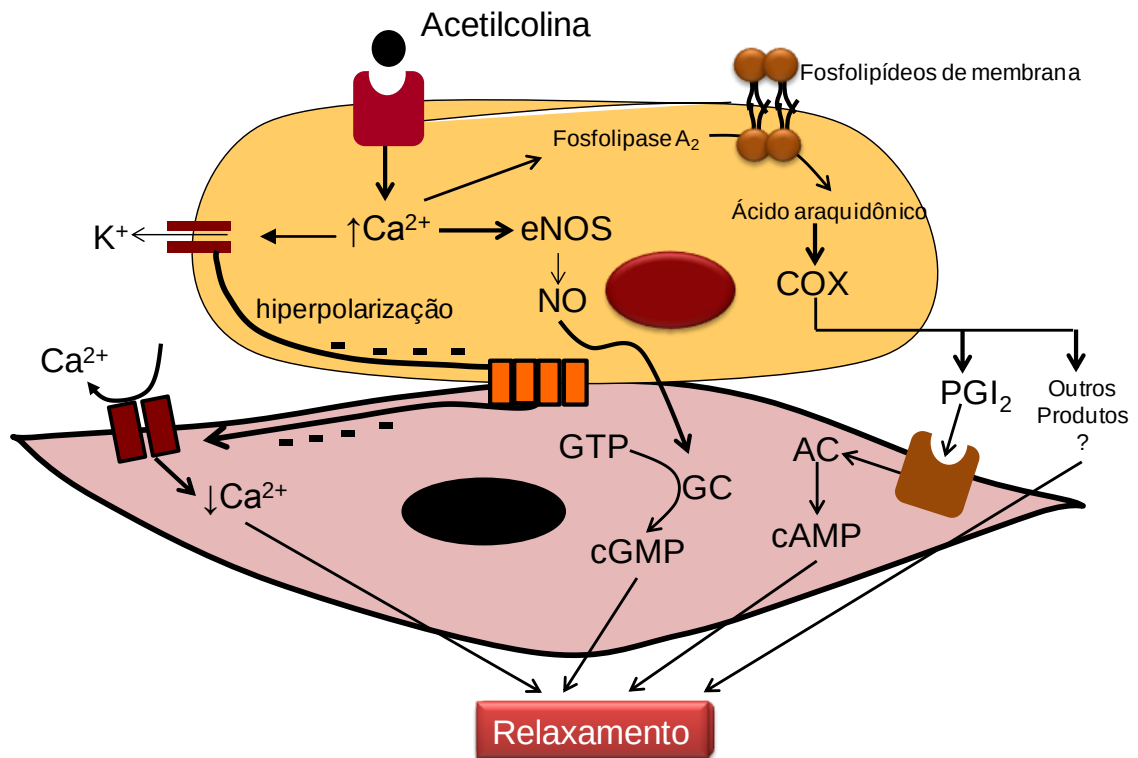
É importante chamar a atenção que a resposta dos mediadores dependentes de endotélio não é exclusivamente dependente de NO (RAMLI et al., 2011). Experimentos *in vitro* têm mostrado que em vasos de condutância como a aorta, a resposta vasodilatadora da acetilcolina é predominantemente mediada por NO (FREITAS et al., 2003; SHIMOKAWA et al., 1996). Entretanto, em vasos de resistência, além do NO, a abertura de canais de potássio bem como produtos da enzima COX contribuem para vasodilatação dependente de endotélio (GIANCHINI et al., 2009; HILGERS et al., 2006) (Figura 5). Embora tradicionalmente a disfunção endotelial seja definida de forma simplista como uma redução na produção e/ou biodisponibilidade do NO, vários outros processos celulares podem estar alterados nas células endoteliais.

Os canais de potássio exercem importante papel no controle do tônus vascular. Atualmente, alguns abridores dos canais de potássio são utilizados como agentes anti-hipertensivos, como o Minoxidil, Diazóxido e Cromacalina. Os canais de

potássio representam a maior e mais diversa classe de canais iônicos e são classificados em quatro subgrupos de acordo com sua topologia (ALEXANDER et al., 2008): canais de potássio sensíveis ao cálcio (K_{Ca}), canais de potássio sensíveis à voltagem (K_v), canais de potássio retificadores de influxo (K_{ir}) e canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{atp}). Os canais de potássio, especialmente os K_{Ca} são moléculas chaves na regulação de eventos de membrana na célula endotelial (NESLON e QUAYLE, 1995). Esta família de canais de potássio é ainda dividida em três subfamílias, os canais de baixa (SK_{Ca}) e intermediária (IK_{Ca}) condutância e os canais de larga condutância (MaxiK ou BK_{Ca}). Os canais SK_{Ca} e IK_{Ca} estão presentes predominantemente no endotélio, enquanto os BK_{Ca} estão predominantemente presentes na célula do músculo liso vascular (DALSGAARD, KROIGAARD et.al., 2010). O estudo das subfamílias dos K_{Ca} é realizado através da administração de diferentes bloqueadores, descritos na tabela 1.

Embora os canais de potássio nas células de músculo liso tenham sido fortemente estudadas, o papel dos canais de potássio presentes no endotélio é pouco compreendido. Na célula endotelial, a abertura de canais de potássio gera o efluxo de K^+ , hiperpolarizando a membrana celular. A hiperpolarização do endotélio é transmitida para células da musculatura lisa vascular, através de junções comunicantes denominadas de *gap junctions*, resultando no fechamento de canais de cálcio voltagem dependente na célula muscular lisa (Figura 5) (BONNET e ARCHER, 2009). Desta forma, é possível que um aumento na expressão de canais de potássio no endotélio represente um importante mecanismo de controle do tônus vascular, compensando diminuição da biodisponibilidade de NO (GIANCHINI, et al., 2009).

Figura 5: Mecanismo de relaxamento da musculatura lisa vascular.



A interação de um agonista, como acetilcolina ou bradicinina, com seu receptor endotelial promove uma alteração conformacional no receptor com ativação de segundo mensageiro, que tem como resultado, o aumento de Ca^{2+} intracelular. O aumento de cálcio intracelular pode resultar em 3 eventos: 1) A elevação de Ca^{2+} intracelular, resulta na abertura dos canais de potássio presentes no endotélio, promovendo o efluxo deste íon da célula endotelial. A diminuição de K^+ intracelular promove uma geração de cargas negativas na membrana celular, tornando-a hiperpolarizada. Esta hiperpolarização é transmitida para célula muscular lisa por junções comunicantes denominadas *gap junctions*. A hiperpolarização da célula muscular lisa resulta no fechamento dos canais de cálcio presentes na célula muscular, causando o relaxamento do vaso. 2) A elevação de Ca^{2+} promove a ativação da enzima fosfolipase A₂. Quando ativa, esta enzima catalisa a hidrólise de moléculas de fosfolípido de membrana, originando ácido araquidônico (AA). O AA pode sofrer duas rotas oxidativas enzimáticas. Uma dessas é via COX, que dará origem à PGI₂ e outros produtos. A célula muscular lisa possui um receptor acoplado à proteína G que possui sítio de ligação para prostaciclina. A ligação como receptor promove ativação da enzima adenilciclase. Uma vez ativa, esta enzima converte parte do ATP intracelular em AMPc, causando relaxamento da musculatura. 3) A elevação de Ca^{2+} intracelular ativa a eNO. A ativação de eNOS promove a síntese de NO, que de forma parácrina ativa a enzima guanilatociclase presente na célula muscular lisa. Uma vez ativa, essa enzima converte parte do GTP intracelular em GMPc, causando relaxamento da musculatura lisa.

Tabela 1: **Bloqueadores das 3 subfamílias dos K_{Ca}**

Canal	Condutância	Bloqueador*
K_{Ca} 1.1	Bk _{Ca}	TEA; Iberotoxina; Caribtoxina; Paxiline
K_{Ca} 2.1	SK _{Ca}	Apamina; UCL 1684; UCL 1848
K_{Ca} 2.2	SK _{Ca}	Apamina; UCL 1684; UCL 1848
K_{Ca} 2.3	SK _{Ca}	Apamina; UCL 1684; UCL 1848
K_{Ca} 3.1	IK _{Ca}	TRAM-34; Caribtoxina

Adaptada de DALSGAARD, KROIGAARD et.al., 2010

*Doses/concentrações elevadas de TEA podem resultar no bloqueio de SK_{Ca}

Além da abertura de canais de K_{Ca}, agentes como acetilcolina e bradicinina podem gerar vasodilatação através do aumento da produção de prostanóides pela célula endotelial. A enzima cicloxigenase é responsável pelos dois primeiros passos na síntese de prostanóides, que são importantes mediadores inflamatórios. Dentre estes destacam-se as prostaglandinas PGE₂ e a PGI₂, por se apresentarem como potentes agentes vasodilatadores (WILLIAMS e PECK, 1977). Existem duas isoformas desta enzima: COX-1 e COX-2, sendo codificadas por dois diferentes genes (GROSSER et al. 2002). Vários trabalhos relatam o aumento da expressão de COX-2 durante inflamação sistêmica com consequente disfunção endotelial (FOUDI et al., 2009). Interessantemente, um trabalho do nosso grupo mostrou um aumento da expressão de COX-2 em vasos de animais com periodontite (MENDES et al., 2014). A COX-2 pode ter um papel vascular protetor na doença periodontal, contrabalanceando a disfunção endotelial através da produção de prostanóides vasodilatadores (FOUDI et al., 2009).

Diante da importância das alterações causadas pela periodontite nas células endoteliais, e pela falta de compreensão deste processo, há a necessidade do entendimento da relação desta inflamação na cavidade bucal e as alterações vasculares. As evidências citadas acima mostram que uma situação de risco, representada pela disfunção endotelial pode estar mascarada por uma alteração em outros mecanismos celulares além da produção/biodisponibilidade de NO. A clareza

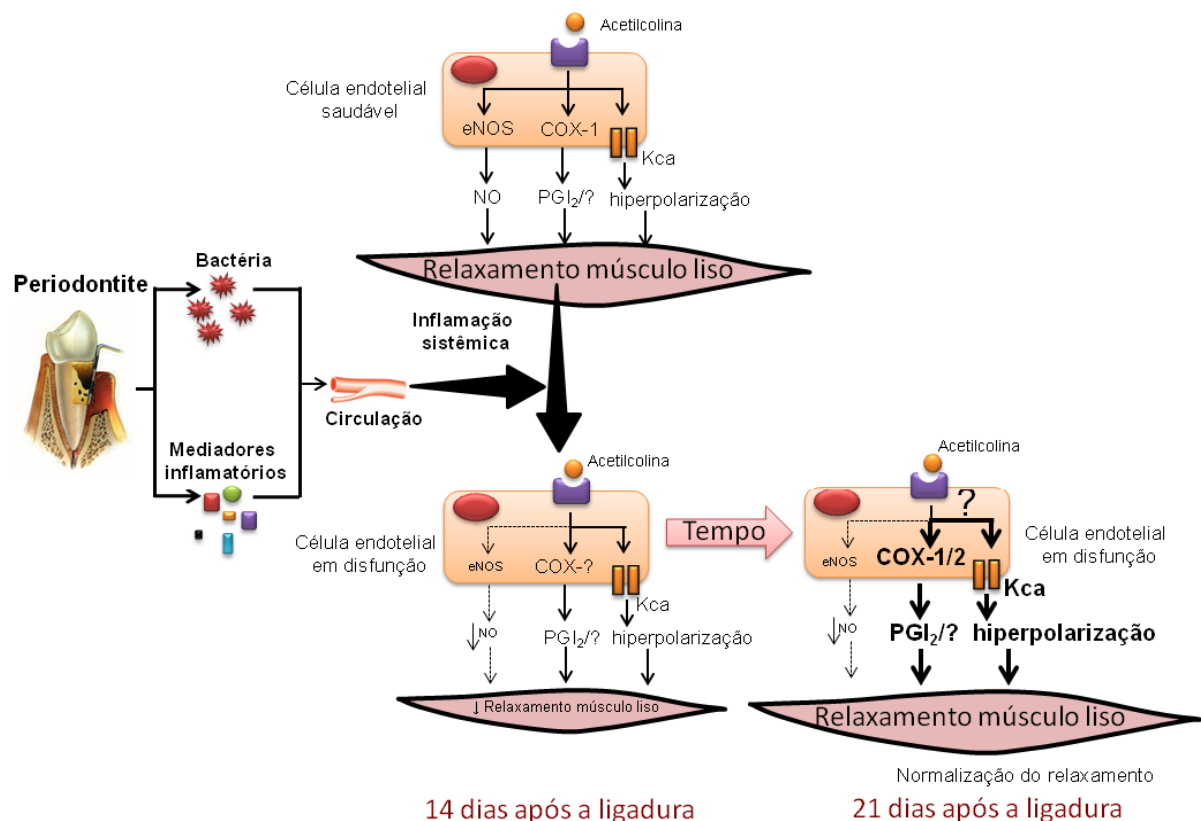
destes processos permitirá uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença periodontal e sua relação com as alterações cardiovasculares.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho é estudar o envolvimento da COX e canais de potássio na vasodilatação dependente de endotélio durante a periodontite (Figura 6).

Figura 6: Representação esquemática dos objetivos centrais do trabalho.



O processo inflamatório da periodontite não fica restrito à cavidade bucal, ele ganha a circulação sistêmica causando diversas alterações, como a inflamação da célula endotelial. Esta inflamação resulta na diminuição da biodisponibilidade do NO. Quando a acetilcolina se liga ao seu receptor na célula endotelial, esta agora inflamada libera uma menor quantia de NO, resultando em uma diminuição da resposta vasodilatadora dependente de endotélio. Com o tempo, acreditamos que a diminuição da liberação de óxido nítrico, resulta em aumento da expressão de uma, ou das duas outras vias de vasodilatação (COX e canais de potássio). Este aumento da expressão dessas (s) via

(s) de vasodilatação mascara a disfunção endotelial, num mecanismo fisiopatológico de compensação à redução da biodisponibilidade de óxido nítrico causada pelo periodontite.

A disfunção endotelial causada pela periodontite, promove um desbalanço negativo na via do NO no décimo quarto dia após a colocação da ligadura. Isto é claramente observado quatorze dias após a indução de periodontite experimental em ratos (BRITO et al., 2013). Este desbalanço não é mais observado no vigésimo primeiro dia após a indução do processo inflamatório (MENDES, et al., 2014). As vias COX e canais de potássio podem ter sofrido um desbalanço positivo, mascarando a diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico. Diante estas circunstâncias, o estudo deste mecanismo compensatório é de grande importância para a compreensão das alterações provocadas pela periodontite, seja pela diminuição da liberação de óxido nítrico, seja pelo aumento da expressão de outras vias vasodilatadoras.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- No décimo quarto dia após a colocação das ligaduras, avaliar a reatividade vascular de animais e quantificar a perda óssea para confirmação da presença do processo inflamatório.

- Avaliação da perda óssea em diferentes tempos após a colocação das ligaduras nos animais para caracterização da periodontite.

- Avaliação da função endotelial em diferentes tempos após a colocação da ligadura.

- Avaliar, através de ferramentas farmacológicas, o envolvimento da COX e canais de potássio na vasodilatação dependente de endotélio em animais com periodontite.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

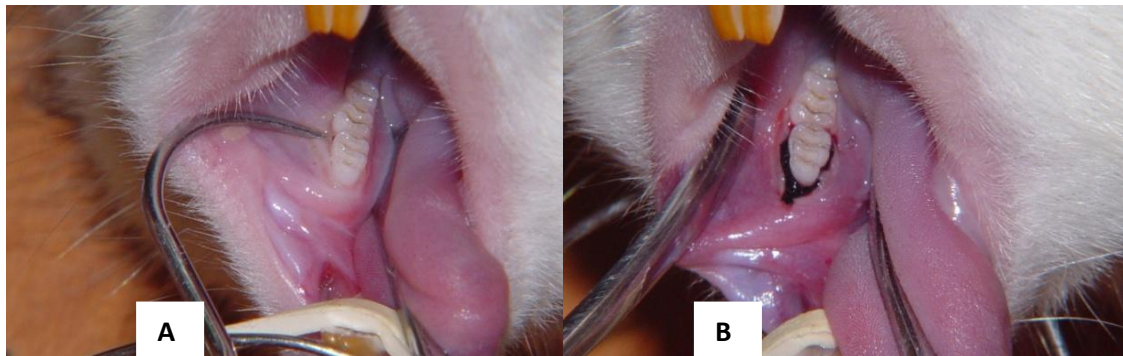
3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar adultos, de 3 meses de idade, pesando entre 200 a 300g. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os mesmos foram mantidos, durante todo o período do experimento, em ambiente com temperatura de 21 ± 2 °C e ciclo de claro/escuro (12/12h) controlado automaticamente, bem como tiveram livre acesso à água e comida. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEPG (número do protocolo de aprovação (21142/2013 – Anexo I) e os animais foram manipulados conforme recomendações da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didático (DBCA), publicado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2. PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA

Os animais foram anestesiados por uma mistura contendo quetamina (75 mg/kg) e xilazina (15 m/kg), injetados via intraperitoneal, e posicionados em um aparato de Doku, a fim de que permanecessem com a boca aberta para a colocação das ligaduras. A indução da doença periodontal foi feita com a colocação de uma ligadura com fio de algodão (4/0) nos primeiros molares inferiores direito e esquerdo, e nos segundos molares superiores direito e esquerdo, tomando cuidado para que o fio penetrasse no sulco gengival, portanto em íntima proximidade aos tecidos gengivais (Figura 7), ficando o nó na região mesial no inferior e lingual no superior. Os animais falso-operados foram submetidos ao mesmo procedimento, entretanto não foi realizada a fixação da ligadura.

Figura 7: **Colocação das ligaduras nos ratos.**

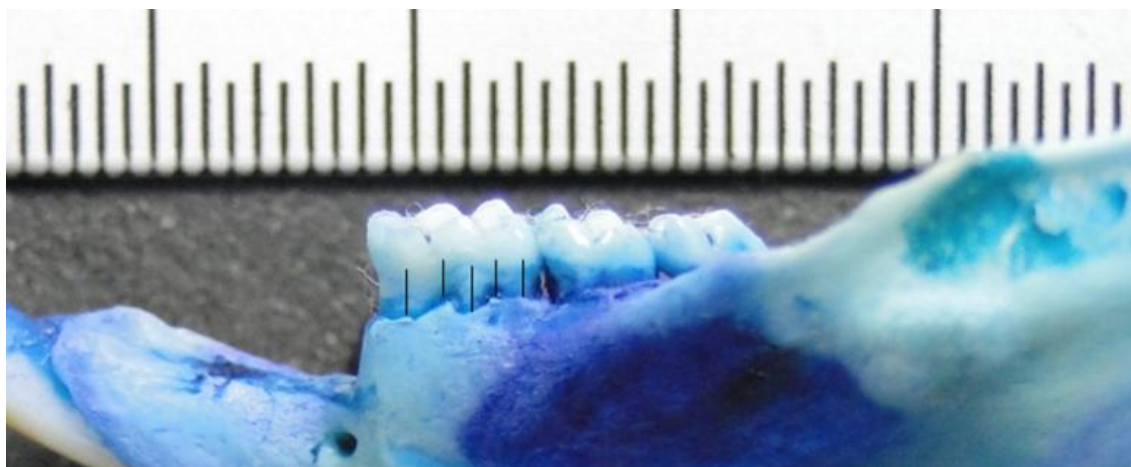


A: dente sendo luxado com o auxílio de sonda exploradora com o propósito de espaçar os molares permitindo a colocação da ligadura. B: ligadura finalizada.

3.3. AVALIAÇÃO DA PERDA ÓSSEA: MORFOMÉTRICO

Após a morte dos animais, a mandíbula (primeiro molar) e maxila (segundo molar) foram retiradas para análise da perda óssea induzida pela ligadura. Efetuada a retirada do tecido gengival da região das hemi-mandíbulas e maxilas, a parte óssea subjacente foi submetida a um procedimento de fervura em água por 5 minutos, com posterior imersão das amostras em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10V ou 3% por 12 horas. Depois das amostras estarem bem secas, estas foram coradas por 1 minuto com azul de metileno (1 g/100 mL), para delinear a linha da junção esmalte-cimento. O método utilizado para quantificar a perda óssea periodontal foi adaptado de Björnsson et al. (2003). As amostras foram fotografadas em Câmera Digital (Sony Cybershot DSC 707, 5.0, Sony Brasil Ltda), salvas em um computador e as medidas, da região lingual (mandíbula) e vestibular (maxila) da área localizada entre a junção esmalte-cimento e a borda de osso alveolar remanescente (Figura 8), foram analisadas pelo programa Image Pro Plus® Version 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Figura 8: **Mandíbula corada pronta para avaliação da perda óssea.**

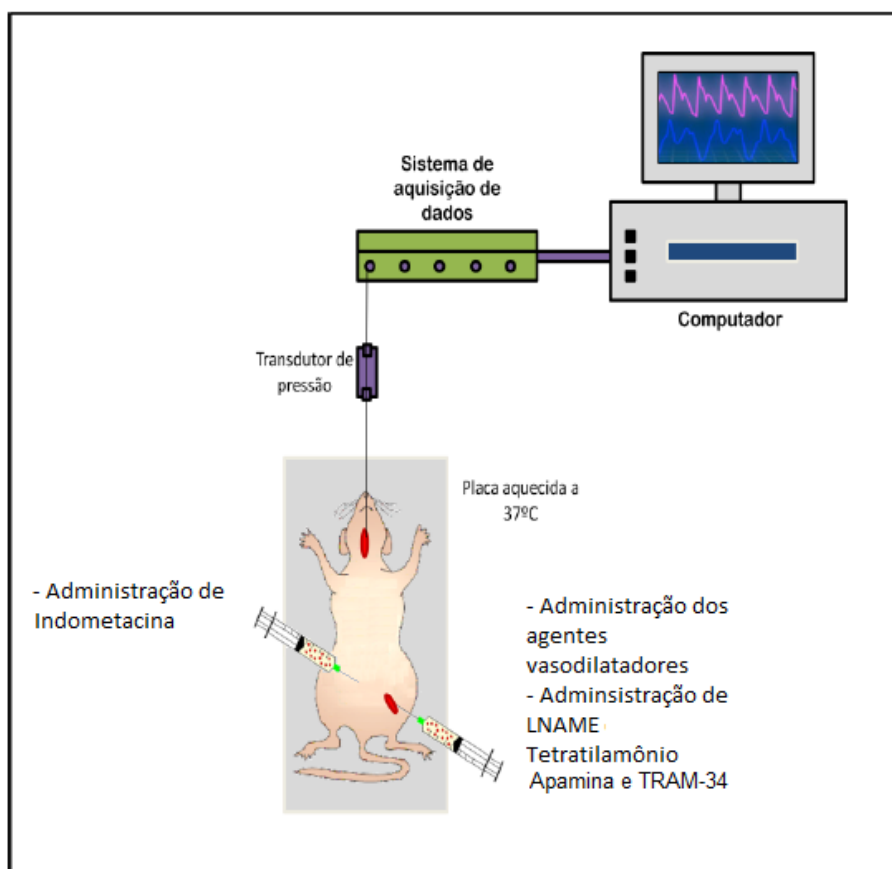


A peça sofre um tratamento com fervura, imersão de 12 horas em peróxido de hidrogênio 3%, e são coradas com azul de metileno (1 g/100 mL), para delinear a linha da junção esmalte-cimento. As linhas verticais presentes no primeiro molar inferior indicam a distância entre a crista alveolar e a junção cimento-esmalte, utilizada para avaliação da perda óssea alveolar.

3.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

Os animais foram anestesiados por uma mistura contendo cetamina (75 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), injetados via intramuscular. Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida (temperatura entre 35 e 36° C). Após a localização da veia femoral é feita a inserção de uma agulha acoplada a uma cânula de polietileno (PE 50) e seringa. Esse acesso venoso tem como finalidade a administração dos compostos que serão utilizados nos estudos. Na sequência, a artéria carótida esquerda foi localizada e, de forma cuidadosa e rápida, separada do nervo vago e tecidos adjacentes. Feito isto, foi realizada a inserção de um catéter de polietileno, devidamente heparinizado, o qual é firmemente amarrado na artéria e conectado a um transdutor de pressão acoplado ao PowerLab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Austrália) (Figura 9). 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 estabilização os animais foram submetidos à análise da reatividade vascular.

Figura 9: Representação esquemática do procedimento de avaliação do parâmetro cardiovascular e administração dos reagentes.



Através do acesso femoral é realizada a administração de três doses crescentes dos componentes vasodilatadores (acetilcolina e nitroprussiato de sódio). Através deste acesso é realizada também a administração de LNAME, Tetraetilamônio, Apamina e TRAM-34. A Indometacina é administrada via intraperitoneal.

4. COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS

- Acetilcolina, Nitroprussiato de sódio, LNAME, Tetraetilamônio, Indometacina, Apamina e TRAM-34 (Sigma ChemicalCo., St. Louis, MO, EUA);
- Quetamina (Parke-Davis, São Paulo, SP, Brasil);
- Heparina sódica (Cristália Produtos Farmacêuticos, São Paulo, SP);
- Xilazina (RonpumTM, Bayer; São Paulo, SP, Brasil).

A Acetilcolina, o Nitroprussiato de sódio e a Apamina foram preparados em água destilada. Suas diluições para administração das diferentes doses foram realizadas em solução fisiológica estéril.

O Tetraetilamônio e o LNAME foram dissolvidos em solução fisiológica imediatamente antes de sua administração intravenosa.

A Indometacina foi dissolvida em 5% de carbonato de sódio em solução fisiológica imediatamente antes de sua administração intraperitoneal. A indometacina é praticamente insolúvel em água, a adição de carbonato de sódio se faz necessária para a solubilização do fármaco, porém, isto inviabiliza a administração intravenosa.

O TRAM-34 foi diluído em DMSO e administrado em um volume que não ultrapassou 0,5 ml/kg. Foi demonstrado que a administração do solvente neste volume não altera significativamente a pressão arterial dos animais (SORDI et al., 2011)

5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

5.1 PROTOCOLO 1

No dia zero, os animais foram randomizados e separados em dois grupos. Metade dos animais recebeu as ligaduras para indução da periodontite, e a outra metade passou pela falsa-cirurgia (as ligaduras foram colocadas e retiradas imediatamente), conforme descrito no item 3.2. No décimo quarto dia, os animais foram novamente anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial (descrito no item 3.4). Na sequência foram administradas as doses crescentes de acetilcolina e nitroprussiato de sódio (3, 10 e 30 nmol/Kg i.v.) e se procedeu à análise do valor da redução da pressão arterial resultante da administração de cada um destes compostos. Os animais foram mortos por sobredose anestésica, e então as mandíbulas e maxilas foram removidas para avaliação da perda óssea (Figura 11).

5.2 PROTOCOLO 2

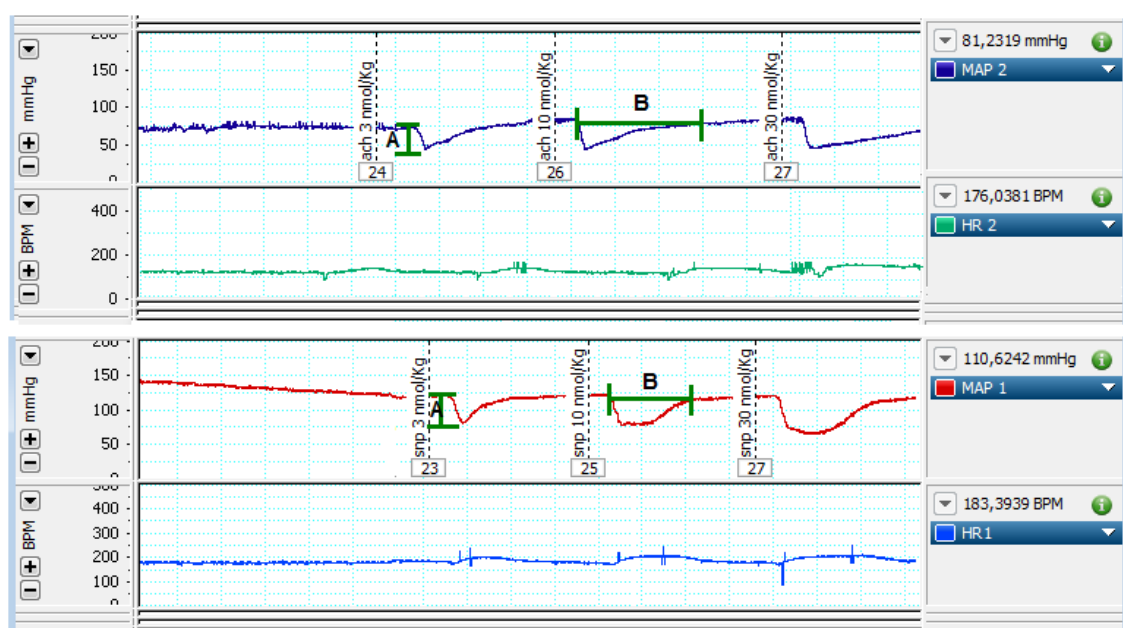
Protocolo semelhante ao anterior, entretanto os animais foram preparados para o registro da pressão arterial vinte e um dias após a colocação da ligadura ou falsa-cirurgia (Figura 11). Os animais foram randomizados para receberem o seguinte tratamento:

- **Grupo 1:** Animais com ligadura e falso operado receberam administração de Ach e SNP (3, 10 e 30 nmol/Kg i.v.). Logo após a última dose de SNP foi injetado LNAME (20 mg/kg, i.v.), indometacina (10 mg/Kg i.p.) e TEA (30 mg/Kg i.v.). Estes três compostos foram administrados em um intervalo de aproximadamente 5 minutos. Após um intervalo de 20 minutos foram realizadas novas administrações i.v. de Ach e SNP;
- **Grupo 2:** Animais com ligadura e falso operado receberam administração de Ach e SNP (3, 10 e 30 nmol/Kg i.v.). Logo após a última dose de SNP foi injetado LNAME (20 mg/kg, i.v.). Após 20 minutos foram realizadas novas administrações de Ach e SNP;
- **Grupo 3:** Animais com ligadura e falso operado receberam administração de Ach e SNP (3, 10 e 30 nmol/Kg i.v.). Logo após a última dose de SNP foi injetado indometacina (10 mg/Kg i.p.). Após 20 minutos foram realizadas novas administrações de Ach e SNP;
- **Grupo 4:** Animais com ligadura e falso operado receberam administração Ach e SNP (3, 10 e 30 nmol/Kg i.v.). Logo após a última dose de SNP foi injetado TEA (30 mg/Kg). de. Após 20 minutos foram realizadas novas administrações de Ach e SNP;
- **Grupo 5:** Animais com ligadura e falso operado receberam administração Ach e SNP (3, 10 e 30 nmol/Kg i.v.). Logo após a última dose de SNP foi injetado indometacina (10 mg/Kg i.p.) e TEA (30 mg/Kg i.v.). Estes dois compostos foram administrados em um intervalo de aproximadamente 5 minutos. Após um intervalo de 20 minutos foram realizadas novas administrações de Ach e SNP;
- **Grupo 6:** Animais com ligadura e falso operado receberam administração Ach e SNP (3, 10 e 30 nmol/Kg i.v.). Logo após a última dose de SNP foi injetado apamina (75 µg/Kg i.v.) e TRAM-34 (1 mg/Kg i.v.). Estes dois compostos foram administrados

em um intervalo de aproximadamente 5 minutos. Após um intervalo de 20 minutos foram realizadas novas administrações i.v. de Ach e SNP.

Para cada grupo se procedeu à análise da redução da pressão arterial média e do tempo de vasodilatação (Figura 10) resultante da administração de cada um dos agentes vasodilatadores, antes e depois do tratamento. Os animais foram mortos por sobredose anestésica, e então as mandíbulas e maxilas foram removidas para avaliação da perda óssea (Figura 11).

Figura 10: **Registro típico dos agentes vasodilatadores Ach e SNP.**

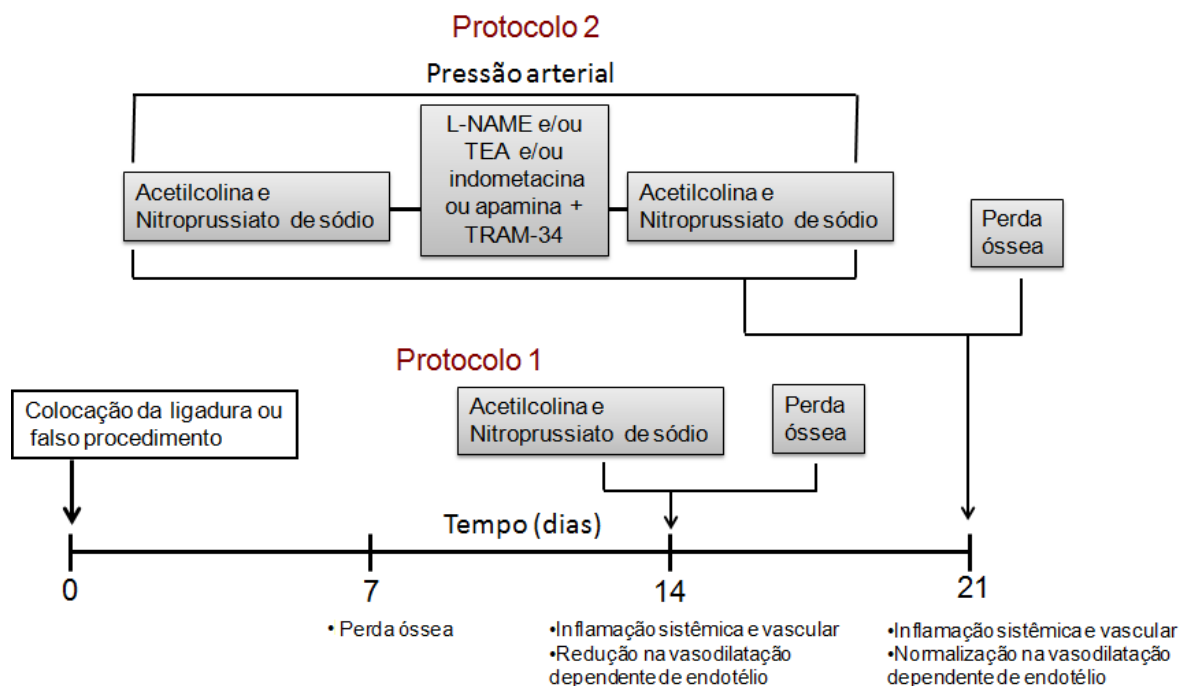


Durante a administração dos agentes vasodilatadores foram avaliados a redução da pressão arterial média (A) e/ou o tempo de vasodilatação (B).

A administração de LNAME tem com o objetivo estudar a via de vasodilatação do óxido nítrico por ser um inibidor da enzima NOS, a Indometacina é um inibidor de ambas as isoformas de COX (COX-1 e COX-2) e o TEA é um inibidor não seletivo dos canais de potássio. Desta maneira, podem-se comparar os mecanismos de vasodilatação dos grupos experimentais na diminuição da atividade da NOS, COX e canais de potássio. A apamina é um inibidor seletivo dos SK_{Ca} enquanto o TRAM-34

é um inibidor dos IK_{Ca} . A administração de um inibidor seletivo dos K_{Ca} de baixa condutância, associado à um inibidor seletivo de condutância intermediária, permite o estudo de possíveis alterações na expressão dos canais de potássio de maior importância no endotélio.

Figura 11: **Representação cronológica para avaliação dos parâmetros cardiovasculares e avaliação da perda óssea alveolar.**



Protocolo 1: No dia zero, os animais receberam a ligadura ou foram falso operados. Através de dados na literatura, sabe-se que a periodontite já está instalada a partir do sétimo dia de colocação das ligaduras. No décimo quarto dia após a colocação das ligaduras, os animais foram submetidos à análise da reatividade vascular conforme item 5.1 realizada a avaliação da perda óssea alveolar. Protocolo 2: Vinte e um dias após a colocação das ligaduras era esperado, conforme a literatura (MENDES et. al., 2014), que ocorresse uma normalização na resposta vasodilatadora, mesmo na presença de uma inflamação sistêmica. Foi procedida a avaliação da pressão arterial, conforme descrito no item 5.2. Após o procedimento, as mandíbulas e maxilas foram removidas para avaliação da perda óssea alveolar.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

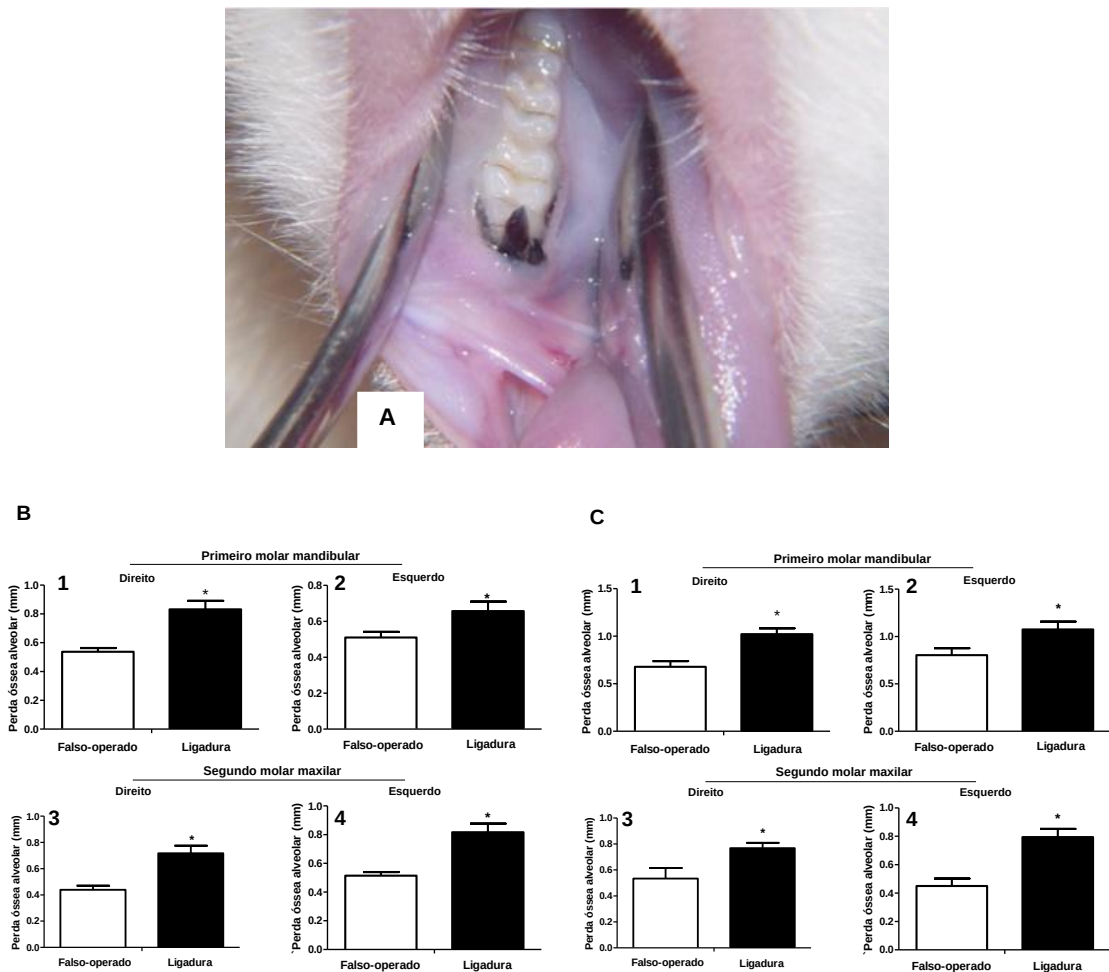
Os resultados são apresentados como média $\pm$ S.E.M. A redução da pressão arterial é expressa em porcentagem, calculada a partir da pressão arterial média. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por teste t de Student ou análise de variância (ANOVA) de duas para medidas repetidas conforme indicado nas legendas das figuras. Os testes de ANOVA foram seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. Os dados apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas, estas condições foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. O nível de significância aceito para os testes foi de $P < 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPadPrism (versão 5.01, San Diego, Califórnia, EUA).

7. RESULTADOS

7.1 PERDA ÓSSEA ALVEOLAR

Quatorze dias após a colocação das ligaduras, foi possível visualizar a formação de um biofilme dental (Figura 12, painel A). Neste mesmo tempo, pode-se verificar a presença de perda óssea do grupo ligadura em relação ao grupo falso-operado no primeiro molar mandibular direito (Figura 12, painel B, 1), primeiro molar mandibular esquerdo (Figura 12, painel B, 2), segundo molar maxilar direito (Figura 12, painel B, 3) e segundo molar maxilar esquerdo (Figura 12, painel B, 4). Pode-se observar também, a presença de perda óssea alveolar vinte e um dias após a colocação das ligaduras. (Figura 12, painéis C 1-4).

Figura 12: Perda óssea alveolar induzida pela colocação de ligaduras.



A partir do sétimo dia de colocação da ligadura, é possível a visualização da formação do biofilme dental (painel A) que permitirá o desenvolvimento de microrganismos responsáveis pela indução do processo inflamatório. Quatorze (painel B) e vinte e um dias (painel C) após a indução da periodontite, pode-se observar o aumento da distância entre a crista alveolar e a junção cimento-esmalte (mm). As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 8 animais. A análise estatística foi realizada por test t de Student (* $p < 0.05$, em relação ao grupo falso-operado).

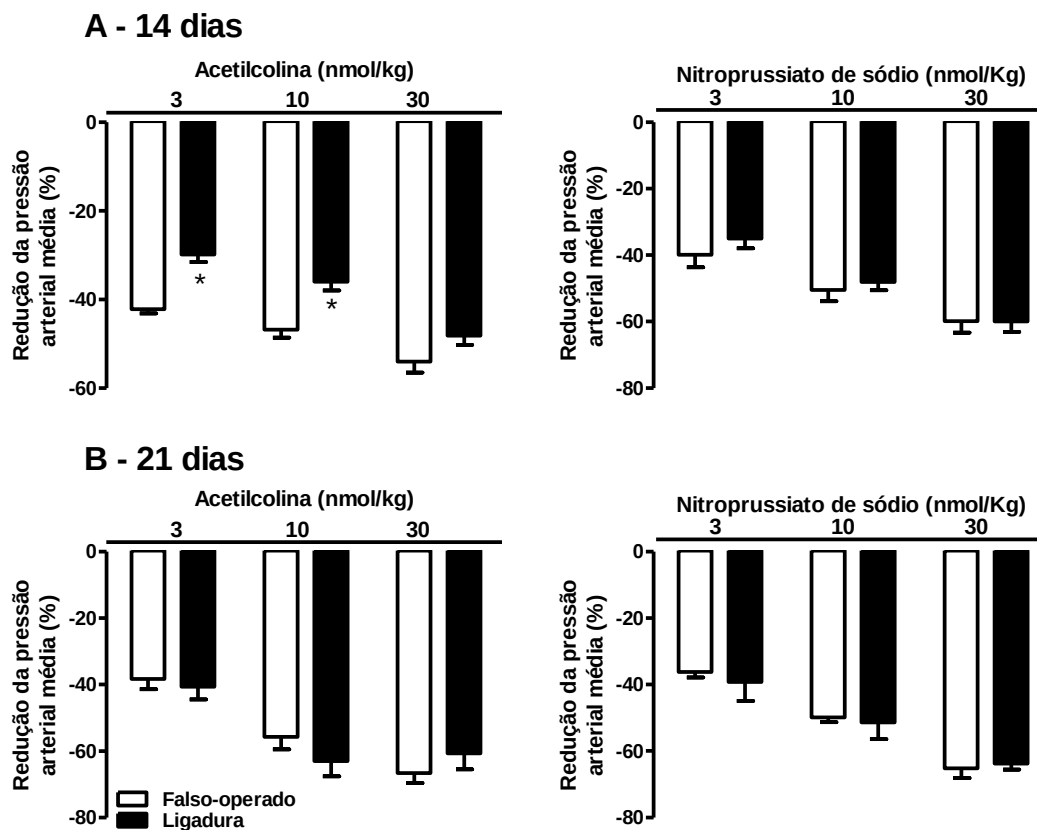
7.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

7.2.1 AVALIAÇÃO TEMPORAL DA FUNÇÃO ENDOTELIAL

Inicialmente avaliamos a função endotelial quatorze e vinte e um dias após a colocação das ligaduras. A resposta vasodilatadora induzida por nitroprussiato de sódio foi semelhante entre falso operado e ligadura tanto em quatorze (Figura 13,

painel A) como em vinte e um (Figura 13, painel B) dias após o procedimento. Por outro lado a resposta vasodilatadora mediada pela acetilcolina foi menor nos ratos avaliados quatorze dias após a colocação das ligaduras (Figura 13, painel A), estando normalizada sete dias depois (Figura 13, painel B). Como o objetivo do trabalho foi avaliar os mecanismos envolvidos na restauração da resposta da acetilcolina, todos os experimentos que se seguiram foram realizados vinte e um dias após a colocação das ligaduras ou falso procedimento.

Figura 13: Avaliação temporal da função endotelial de ratos submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.

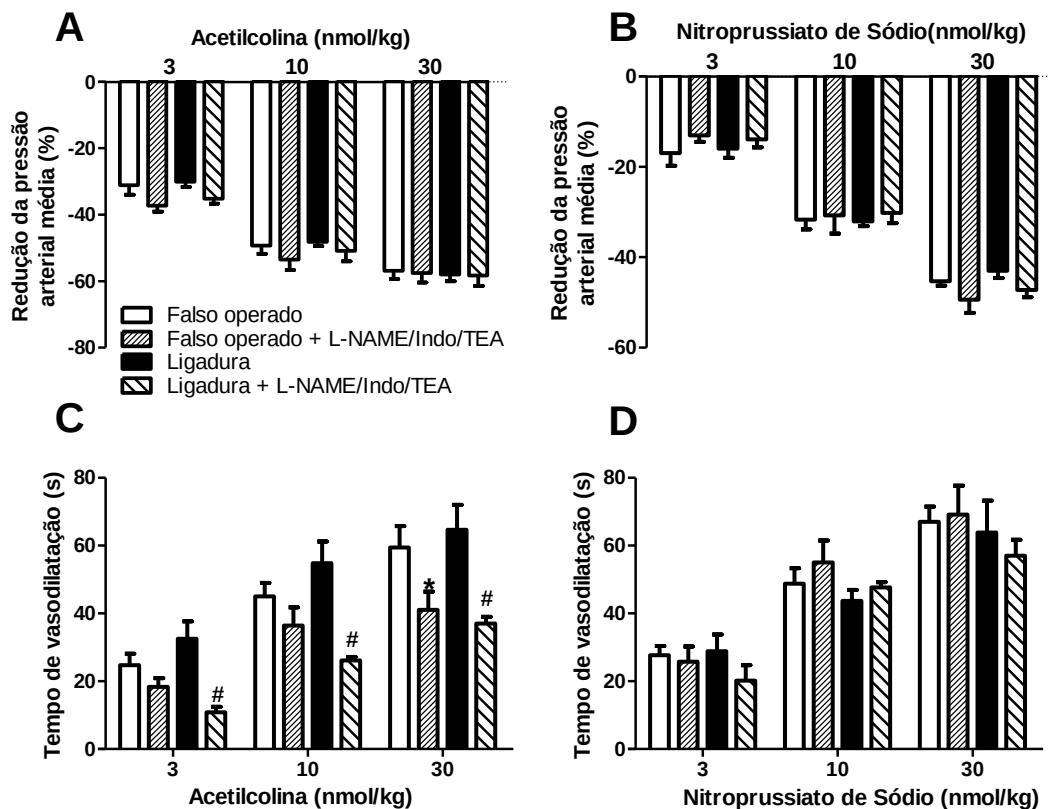


Quatorze (A) ou vinte e um (B) dias após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia, os animais foram preparados para registro da pressão arterial conforme descrito anteriormente. Doses crescentes de acetilcolina e nitroprussiato de sódio (3, 10 e 30 nmol/Kg) foram injetadas (i.v.) e a variação na pressão arterial média foi registrada. As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 8 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (* $p < 0.05$, em relação ao grupo falso-operado).

7.2.2 BLOQUEIO SIMULTÂNEO DA NOS, COX E CANAIS DE POTÁSSIO.

O bloqueio simultâneo da NOS, COX e canais de potássio não alterou a redução da pressão arterial média nem o tempo de vasodilatação do nitroprussiato de sódio (Figura 14, painéis B e D). Embora a redução da pressão arterial induzida pela acetilcolina também não tenha sido afetada pela utilização destas drogas (Figura 14, painel A), o tempo de vasodilatação foi reduzido nas três doses do grupo ligadura e na dose de 30 nmol/Kg do grupo falso-operado (Figura 14, painel C).

Figura 14: Representação da avaliação dos parâmetros cardiovasculares antes e depois da administração de LNAME, Indometacina e TEA.



Vinte e um dias após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia os animais foram preparados para registro da pressão arterial. Doses crescentes de acetilcolina e nitroprussiato de sódio (3, 10 e 30 nmol/Kg) foram injetadas (i.v.) e a variação na pressão arterial média e o tempo de vasodilatação foram registrados. Após a injeção da última dose de nitroprussiato de sódio os animais receberam LNAME (20 mg/kg, i.v.), Indometacina (10 mg/kg, i.p.), e TEA (30 mg/kg, i.v.). Trinta minutos após a injeção destes compostos, outra curva dose resposta para acetilcolina e nitroprussiato de sódio foi realizada e a variação na pressão arterial média e o tempo de vasodilatação foram novamente

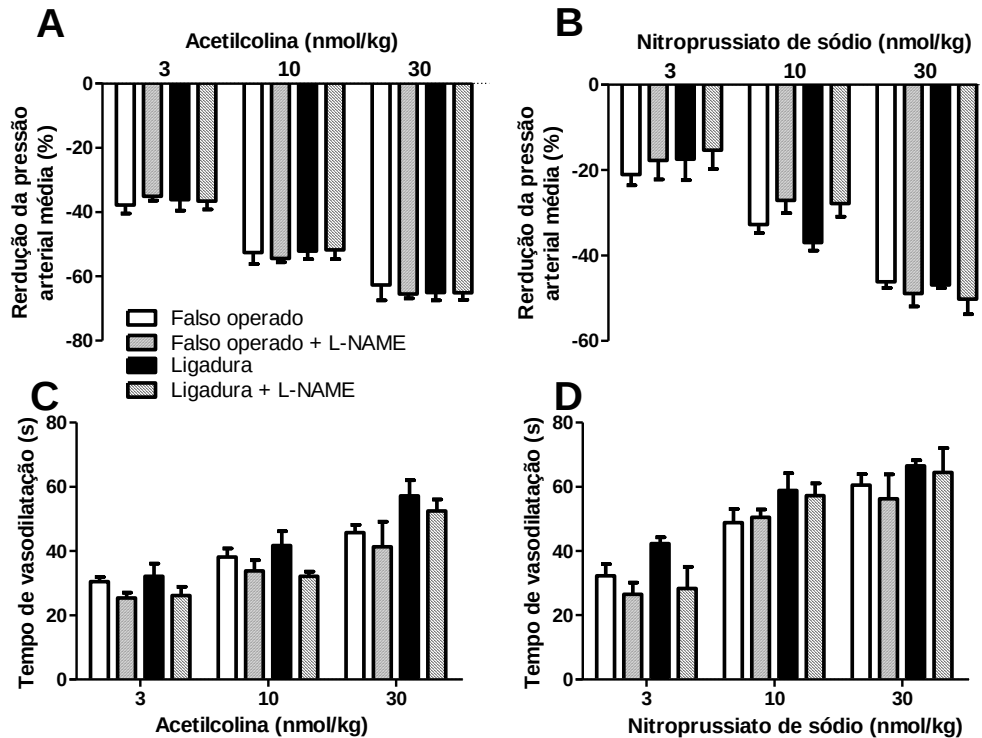
registrados. As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 6 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (* $p < 0.05$, em relação ao grupo falso-operado; # $p < 0.05$, em relação ao grupo ligadura).

7.2.3 BLOQUEIO DA NOS

A influência de cada um dos compostos anteriormente administrados em conjunto foi estudada isoladamente. A figura 15 descreve os valores da reatividade vascular de animais falso operado e ligadura, antes e após a administração de LNAME.

O bloqueio da NOS não resultou em alteração da resposta vasodilatadora dependente de endotélio (Figura 15, painel A), tampouco na resposta vasodilatadora independente de endotélio (Figura 15, painel B). Os painéis C e D da figura 15 mostram que o tempo de vasodilatação também não se alterou com este tratamento.

Figura 15: Representação da avaliação dos parâmetros cardiovasculares antes e depois da administração de LNAME.



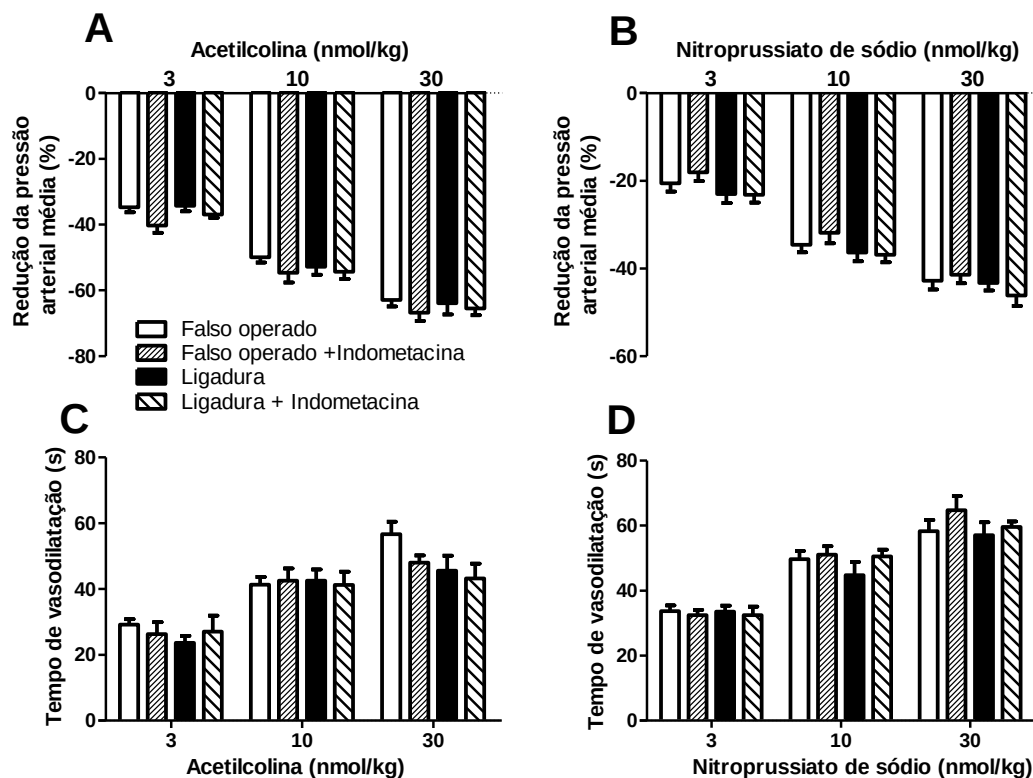
Vinte e um dias após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia os animais foram preparados para registro da pressão arterial. Doses crescentes de acetilcolina e nitroprussiato de sódio (3, 10 e 30 nmol/Kg) foram injetadas (i.v.) e a variação na pressão arterial média e o tempo de vasodilatação foram registrados. Após a injeção da última dose de nitroprussiato de sódio os animais receberam LNAME (20 mg/kg, i.v.). Trinta minutos após a injeção deste composto outra curva dose resposta para acetilcolina e nitroprussiato de sódio foi realizada e a variação na pressão arterial média e o tempo de vasodilatação foram novamente registrados. As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 6 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni.

7.2.4 BLOQUEIO DA COX

A administração de um inibidor não seletivo da COX, a indometacina, não alterou a redução na pressão arterial mediada pela acetilcolina, tampouco a resposta

mediada pelo nitroprussiato de sódio (Figura 16, painéis A e B). Também não houve alteração no tempo de vasodilatação da acetilcolina (Figura 16, painel C) e nitroprussiato de sódio (Figura 16, painel D).

Figura 16: Representação da avaliação dos parâmetros cardiovasculares antes e depois da administração de indometacina.



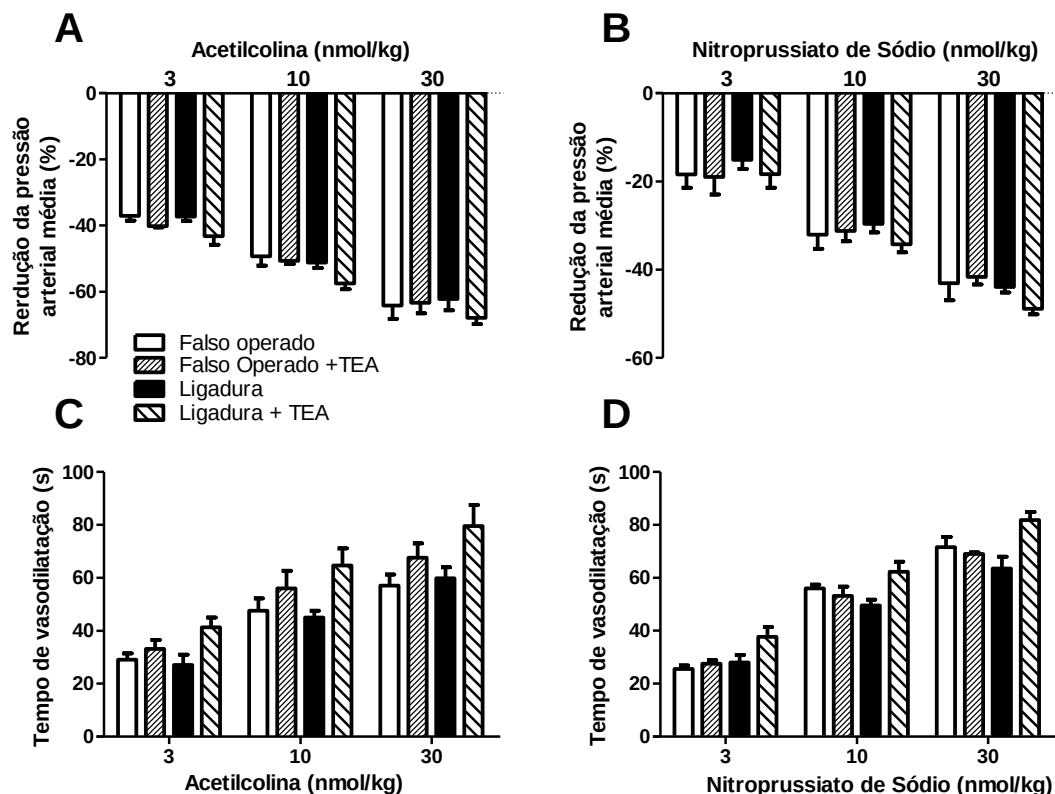
Vinte e um dias após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia os animais foram preparados para registro da pressão arterial. Doses crescentes de acetilcolina e nitroprussiato de sódio (3, 10 e 30 nmol/Kg) foram injetadas (i.v.) e a variação na pressão arterial média e o tempo de vasodilatação foram registrados. Após a injeção da última dose de nitroprussiato de sódio os animais receberam indometacina (10 mg/kg, i.p.). Trinta minutos após a injeção deste composto, outra curva dose resposta para acetilcolina e nitroprussiato de sódio foi realizada e a variação na pressão arterial média e o tempo de vasodilatação foram novamente registrados. As barras representam a média e as linhas acima da barra o erro padrão da média de 6 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni.

7.2.5 BLOQUEIO DOS CANAIS DE POTÁSSIO

7.2.5.1 BLOQUEIO NÃO SELETIVO DOS CANAIS DE POTÁSSIO

O TEA foi testado isoladamente. O bloqueio dos canais de potássio não resultou em alteração da vasodilatação mediada por acetilcolina, nem por nitroprussiato de sódio (Figura 17, painéis A e B). O tempo de vasodilatação em resposta à acetilcolina (Figura 17, painel C) e o tempo de vasodilatação mediada pelo nitroprussiato de sódio (Figura 17, painel D) também não se alteram com o tratamento.

Figura 17: Representação da avaliação dos parâmetros cardiovasculares antes e depois da administração de TEA.



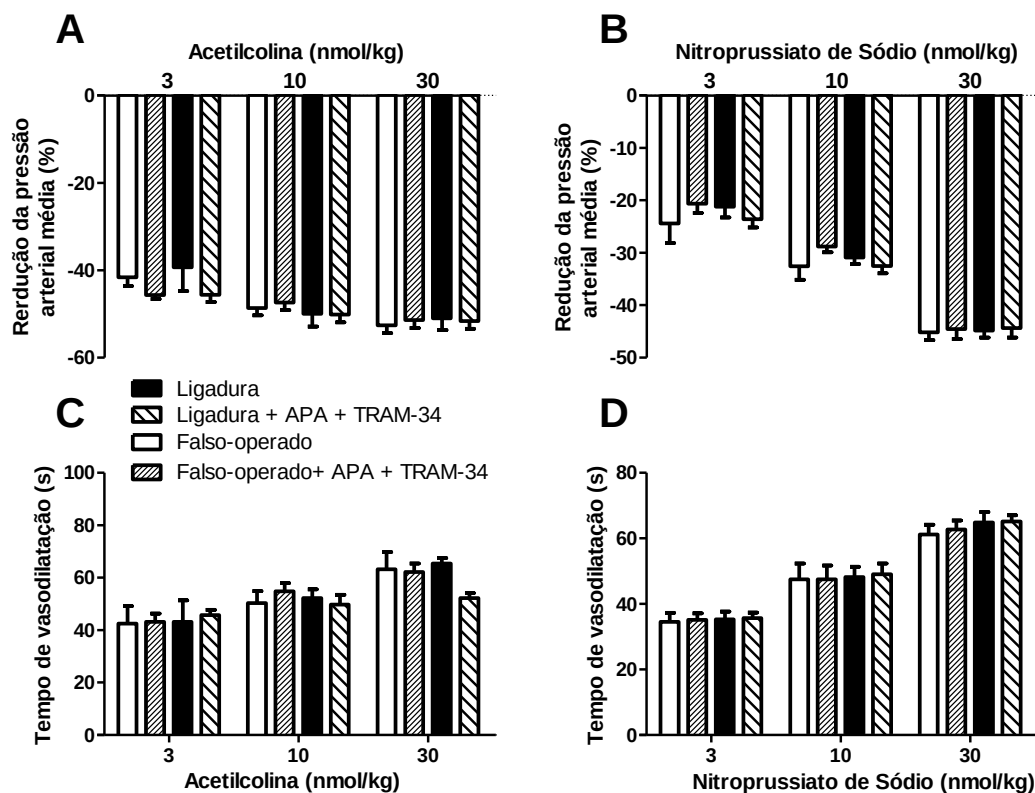
Vinte e um dias após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia os animais foram preparados para registro da pressão arterial. Doses crescentes de acetilcolina e nitroprussiato de sódio (3, 10 e 30 nmol/Kg) foram injetadas (i.v.) e a variação na pressão arterial média e o tempo de vasodilatação foram registrados. Após a injeção da última dose de nitroprussiato de sódio os animais receberam TEA (30 mg/kg, i.v.). Trinta minutos após a injeção deste composto, outra curva dose resposta para

acetilcolina e nitroprussiato de sódio foi realizada e a variação na pressão arterial média e o tempo de vasodilatação foram novamente registrados. As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 6 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni.

7.2.5.2. BLOQUEIO SELETIVO DOS CANAIS DE POTÁSSIO

A administração de Apamina e TRAM-34, inibidores seletivos dos SK_{Ca} e IK_{Ca}, respectivamente, não resultou em alteração na variação da pressão arterial mediada pela acetilcolina (Figura 18, painel A), nem pelo nitroprussiato de sódio (Figura 18, painel B). O tempo de vasodilatação mediado pela acetilcolina (Figura 18, painel C), e pelo nitroprussiato de sódio (Figura 18, painel D), também não sofreram alteração após o tratamento.

Figura 18: Representação da avaliação dos parâmetros cardiovasculares antes e depois da administração de Apamina e TRAM-34



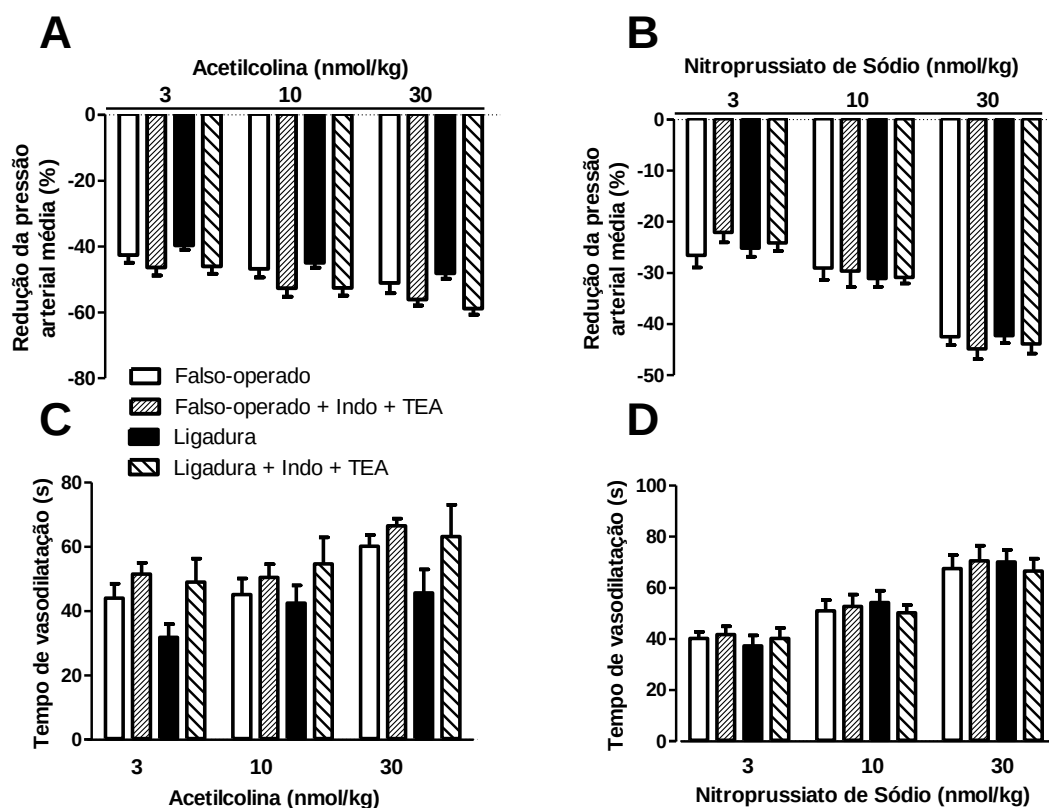
Vinte e um dias após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia os animais foram preparados para registro da pressão arterial. Doses crescentes de acetilcolina e nitroprussiato de sódio (3, 10 e

30 nmol/Kg) foram injetadas (i.v.) e a variação na pressão arterial média e o tempo de vasodilatação foram registrados. Após a injeção da última dose de nitroprussiato de sódio os animais receberam Apamina (75 µg/Kg, i.v.) e TRAM-34 (1 mg/kg, i.v.). Trinta minutos após a injeção destes compostos, outra curva dose resposta para acetilcolina e nitroprussiato de sódio foi realizada e a variação na pressão arterial média e o tempo de vasodilatação foram novamente registrados. As barras representam a média e as linhas acima da barra o erro padrão da média de 6 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (* $p < 0.05$, em relação ao grupo ligadura).

7.2.6 BLOQUEIO SIMULTÂNEO DA COX E DOS CANAIS DE POTÁSSIO

A administração de um inibidor de ambas as isoformas da COX, associado à um inibidor não seletivo dos canais de potássio, não resultou em alteração na variação da pressão arterial mediada pela acetilcolina, nem pelo nitroprussiato de sódio (Figura 19, painéis A e B). O tempo de vasodilatação mediado pela acetilcolina (Figura 19, painel C), e pelo nitroprussiato de sódio (Figura 19 painel D), também não sofreram alteração após o tratamento.

Figura 19: Representação da avaliação dos parâmetros cardiovasculares antes e depois da administração de Indometacina e TEA.



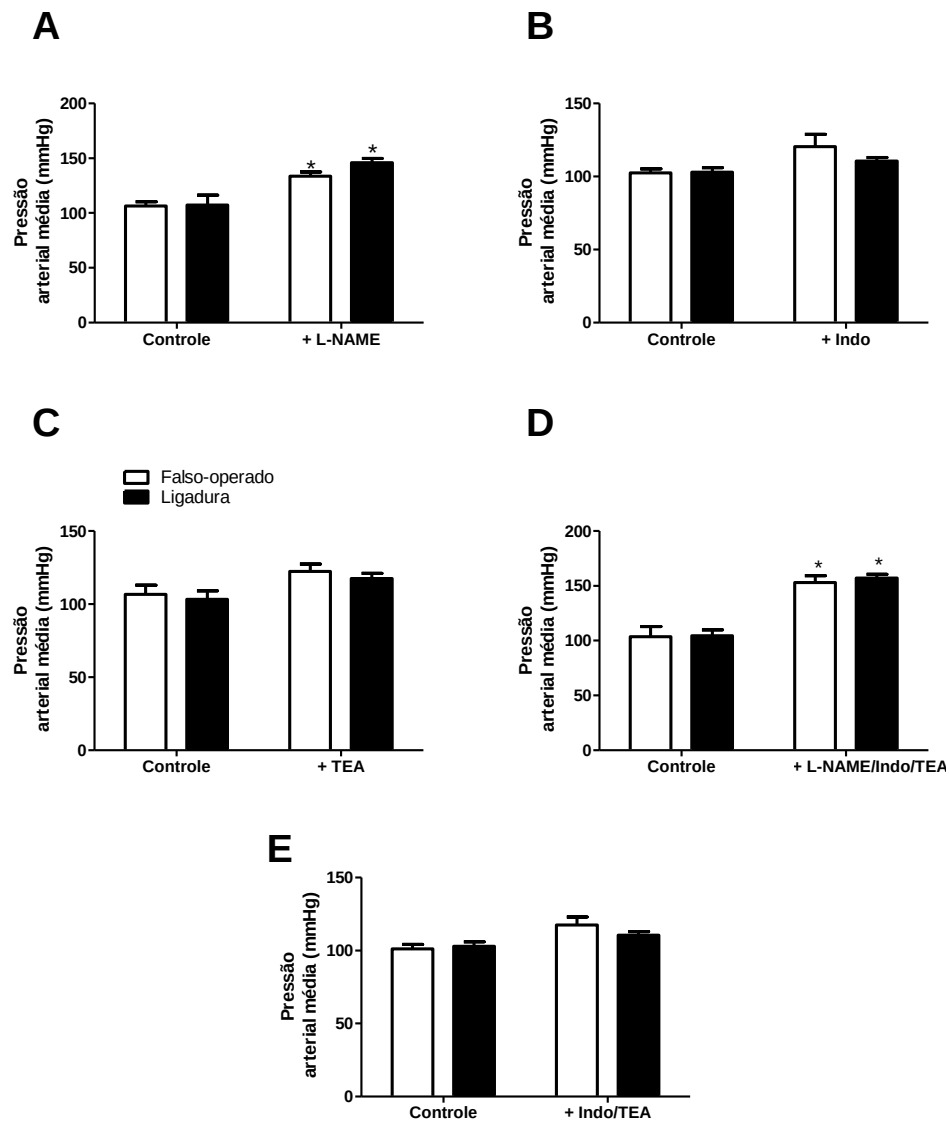
Vinte e um dias após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia os animais foram preparados para registro da pressão arterial. Doses crescentes de acetilcolina e nitroprussiato de sódio (3, 10 e 30 nmol/Kg) foram injetadas (i.v.) e a variação na pressão arterial média e o tempo de vasodilatação foram registrados. Após a injeção da última dose de nitroprussiato de sódio os animais receberam Indometacina (10 mg/Kg, i.p.) e TEA (30 mg/kg, i.v.). Trinta minutos após a injeção destes compostos, outra curva dose resposta para acetilcolina e nitropussiado de sódio foi realizada e a variação na pressão arterial média e o tempo de vasodilatação foram novamente registrados. As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 6 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni.

7.2.7 PRESSÃO BASAL ANTES E APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE LNAME E/OU INDOMETACINA E/OU TEA

Foi avaliada a influência dos compostos na pressão arterial basal, antes e após a administração dos mesmos. Pode-se observar um aumento da pressão arterial basal dos grupos falso-operado e ligadura depois do tratamento com LNAME

(Figura 20, painel A), bem como um aumento na pressão arterial basal depois do tratamento com LNAME, Indometacina e TEA (Figura 20, painel D). O tratamento com Indometacina (Figura 20, painel B) e com TEA (Figura 20, painel C) não resultou em alteração da pressão basal nos animais avaliados. A combinação de Indometacina e TEA também não resultou em alteração da pressão basal (Figura 20, painel E). Os resultados estão expressos em mmHg para avaliar diretamente possíveis alterações na pressão arterial dos grupos tratados.

Figura 20: **Representação da avaliação pressão arterial basal antes e depois da administração de LNAME, Indometacina e/ou TEA.**



Vinte e um dias após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia os animais foram preparados para registro da pressão arterial. A pressão arterial média basal foi registrada antes e 20 minutos após o tratamento com LNAME (20 mg/kg, Painel A), Indometacina (Indo, 10 mg/kg, Painel B), TEA (30 mg/kg, Painel C), associação das três drogas (LNAME/Indo/TEA, painel D) ou associação de Indometacina/TEA (painel E). As barras representam a média e a linhas acima da barra o erro padrão da média de 6 animais. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (* $p < 0.05$, em relação ao respectivo grupo antes do tratamento).

8. DISCUSSÃO

Embora o mecanismo que relaciona a periodontite com a disfunção endotelial não seja totalmente compreendido, vários trabalhos relacionam a inflamação sistêmica causada pela periodontite com o desenvolvimento de doenças sistêmicas (HAYNES e STANFORD, 2003). A inflamação sistêmica leva à alterações vasculares, e isto já foi demonstrado em humanos com periodontite (MERCANOGLU, et al., 2004). Trabalhos prévios de nosso grupo de pesquisa, utilizando um modelo experimental em ratos, demonstram uma relação entre a doença periodontal, aumento de marcadores inflamatórios na circulação e o desenvolvimento de inflamação vascular (BRITO et al., 2013; MENDES et al., 2014). Neste modelo experimental, 7 dias após a colocação das ligaduras a perda óssea já está claramente estabelecida (BRITO et al., 2013; MENDES et al., 2014), entretanto ainda não há alterações sistêmicas claras (BRITO et al., 2013). Quatorze dias após a colocação de ligaduras em ratos, há um aumento em marcadores inflamatórios sistêmicos, como PCR e IL-6, e o desenvolvimento de disfunção endotelial (BRITO et al., 2013, MACHADO et al., 2014). Porém, vinte e um dias após a indução do processo inflamatório ocorre uma normalização da resposta vasodilatadora dependente de endotélio, embora o endotélio continue inflamado e a produção de NO comprometida (MENDES et al., 2014). Porém a presença da inflamação vascular indica que a restauração da resposta vasodilatadora dependente de endotélio, não reflete um endotélio saudável e funcional. Provavelmente a restauração desta resposta é consequência de um mecanismo compensatório, que pode mascarar a diminuição da biodisponibilidade de NO e possíveis riscos cardiovasculares.

Estas evidências destacam a fragilidade da avaliação na função endotelial realizada na prática clínica (HIGASHI et al., 2008; HIGASHI et al., 2009). A simples avaliação da resposta vasodilatadora dependente de endotélio pode mascarar uma inflamação vascular presente, em razão da presença de mecanismos celulares que compensam a deficiência de NO. Ou seja, uma disfunção endotelial pode não ser observada somente pela administração intravenosa de acetilcolina, e isto pode ocultar a presença de um importante fator de risco cardiovascular.

Portanto, a disfunção endotelial definida como uma redução da produção e biodisponibilidade de NO é um conceito muito simplista diante a grandeza das alterações que ocorrem durante a inflamação endotelial. Com o objetivo de compreender parte destas alterações, estudamos outras vias e mediadores de vasodilatação dependente do endotélio, além da via do NO, que podem estar alteradas durante a inflamação endotelial. Além da via do NO, as vias de vasodilatação dependentes do endotélio melhor caracterizadas até o momento são a via da COX e canais de potássio. Alguns trabalhos da literatura mostram que estas vias podem estar alteradas durante a inflamação (GIANCHINI, et al., 2009; MENDES et al., 2014).

Vinte e um dias após a colocação de ligaduras em ratos existem evidências da presença da periodontite, caracterizada pela reabsorção óssea alveolar (MENDES et al., 2014). Por ser um modelo de fácil manuseio e baixo custo (EKUNI et al., 2009), a colocação das ligaduras é o modelo animal mais utilizado no estudo desta patologia (KIMURA et al., 2000). A colocação da ligadura gera pouco dano físico que favoreça a reabsorção óssea.

A maioria dos trabalhos que utilizam o modelo de periodontite induzido por ligadura tem como objetivo a avaliação da inflamação local, portanto estes trabalhos usam apenas uma ou no máximo duas ligaduras em ratos (EKUNI et al., 2009;

EKUNI et al., 2010). Além disso, eles raramente ultrapassam quatorze dias de análise (DE ARAÚJO JR, et al., 2013; GOES et al., 2013; PIMENTEL et al., 2012). Para estudo da perda óssea alveolar e inflamação gengival, a colocação de poucas ligaduras e por curto período de tempo é suficiente. Entretanto, trabalhos prévios da literatura têm mostrado que para o desenvolvimento de efeitos sistêmicos é necessário a colocação de pelo menos três ligaduras (MA et al., 2011,). Contudo, foi demonstrado que colocação de um número ímpar de ligaduras pode afetar o padrão de mastigação, influenciando a reabsorção óssea (DUMITRESCU et al., 2004), por esta razão, optamos pela utilização de quatro ligaduras. Além disso, nosso grupo de trabalho vem demonstrando que a colocação de quatro ligaduras consegue produzir um efeito sistêmico consistente (BRITO et al., 2013; MENDES et al., 2014, MACHADO et al., 2014).

Assim como demonstrado em outros trabalhos, foi observada uma redução da resposta vasodilatadora da acetilcolina quatorze dias após a colocação das ligaduras (BRITO et al., 2013, MACHADO et al. ,2014), com uma aparente normalização desta resposta após vinte e um dias (MENDES et al., 2014), reforçando a ideia de um possível mecanismo de compensação da resposta vasodilatadora frente à diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico observada neste período (MENDES et al., 2014).

Avaliamos o efeito da inibição simultânea das três principais vias de vasodilatação dependente de endotélio (NOS, COX e canais de potássio) em ratos com periodontite experimental. Após a administração conjunta dos inibidores dessas vias (LNAME, indometacina e TEA), pode-se observar uma redução do tempo de vasodilatação mediada por acetilcolina no grupo falso-operado. Este fato revela a importância dessas três vias de vasodilatação no mecanismo de relaxamento vascular: o bloqueio, mesmo que parcial dessas vias no animal falso-operado promove uma alteração na resposta vascular. Esta diminuição vai ao encontro da literatura que mostra a que estas vias são fundamentais para o relaxamento do vaso (FUJIWARA et al., 2012). Embora não tenhamos observado alterações na redução da pressão arterial média, o bloqueio farmacológico destas três vias foi capaz reduzir

o tempo de vasodilatação também nos animais ligadura. Observa-se uma redução significativa do tempo de vasodilatação de todas as doses de acetilcolina no grupo ligadura após o tratamento com os três inibidores. A diminuição no tempo de vasodilatação após o tratamento é muito mais acentuada no animal com ligadura, revelando uma maior importância em alguma dessas vias no mecanismo de vasodilatação deste grupo, sugerindo a importância de uma ou mais vias de vasodilatação vinte e um dias após a colocação de ligaduras.

A administração simultânea dos bloqueadores permite verificar uma alteração no grupo ligadura, mas esta diferença não permite compreender em qual mecanismo isso ocorreu. Uma tentativa de elucidação dessa resposta foi estudar cada uma das vias, utilizando os mesmos bloqueadores, isoladamente para verificação da influência destas vias. Curiosamente, o bloqueio isolado de cada uma das três principais vias de vasodilatação não resultou em alteração significativa na redução da pressão arterial, nem do tempo de vasodilatação dos animais, possivelmente porque que a célula ainda conta com as outras duas vias de vasodilatação que podem estar contrabalanceando o bloqueio de uma única via.

Tem sido demonstrado que a colocação de ligaduras resulta em uma diminuição da produção de NO (BRITO et al., 2013; MENDES et al., 2014). Diante da redução na produção/biodisponibilidade de NO alguns trabalhos mostram que outras vias de vasodilatação podem compensar a carência de NO (FOUND, et al., 2009; GIACHINI et al., 2009), mascarando desta maneira a diminuição da resposta vasodilatadora causada pela disfunção endotelial. O bloqueio simultâneo e não seletivo das vias de vasodilatação mediadas por canais de potássio e pela COX não resultou na alteração da resposta vasodilatadora, tampouco do tempo de vasodilatação dos grupos. Isso se deve, provavelmente pelo fato de que o TEA, inibidor não seletivos dos canais de potássio, tem sua ação bloqueando canais de potássio sensíveis à voltagem, cálcio, ATP e retificadores de influxo. Porém, ele não realiza uma inibição em todos as subfamílias destes canais (DALSGAARD, KROIGAARD et. al., 2010). O endotélio apresenta principalmente canais de potássio sensíveis ao cálcio, predominantemente dos subtipos SK_{Ca}, IK_{Ca}, enquanto o

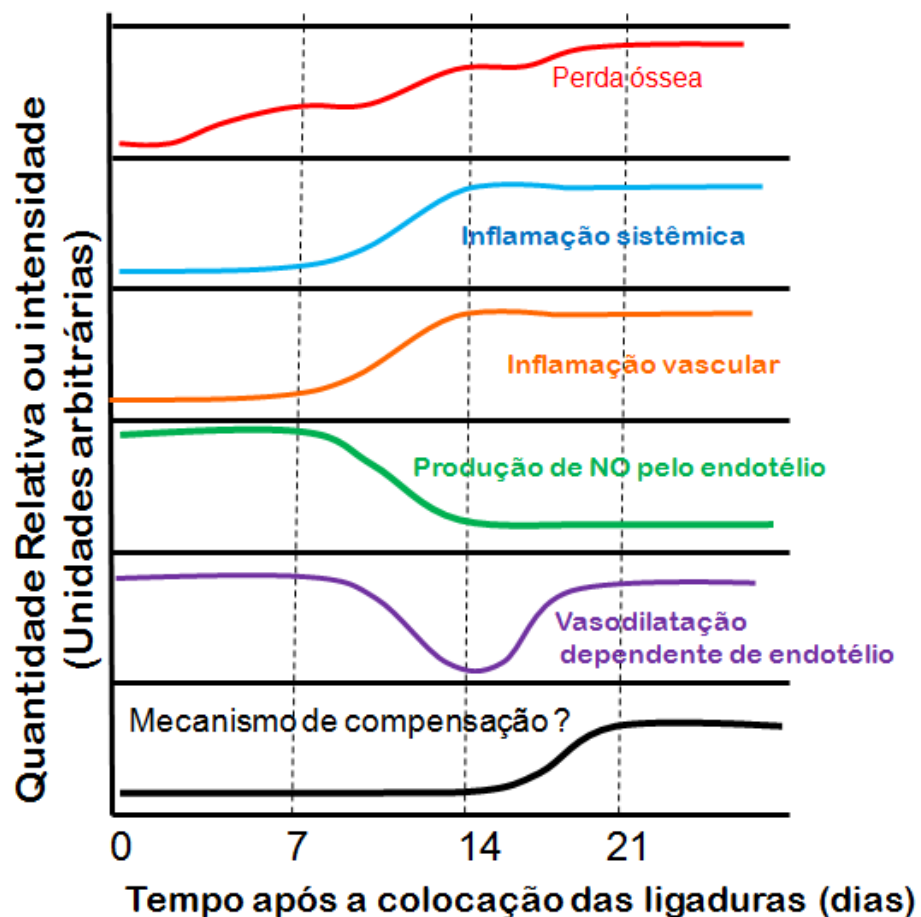
músculo liso, apresenta um predomínio de subtipos BK_{Ca} (DALSGAARD, KROIGAARD et. al., 2010). O TEA bloqueia somente os subtipos dos canais de potássio presentes na musculatura lisa. Portanto a ausência de alteração da resposta vascular após a administração de TEA, sugere que a expressão dos BK_{Ca} na musculatura lisa se mantém inalterada, e parece não ter importância compensatória na disfunção endotelial. Além disso, a célula ainda conta com outras duas vias de vasodilatação: via da NOS e dos canais de potássio (SK_{Ca} , IK_{Ca}).

Buscando estudar uma possível alteração da resposta mediada por canais de potássio na célula endotelial, foi realizada a administração de inibidores seletivos dos subtipos SK_{Ca} e IK_{Ca} . A utilização de inibidores seletivos do K_{Ca} já é bem descrita na literatura (MISHRA et al., 2013). O objetivo inicial foi realizar a administração destes inibidores, associados ao inibidor de ambas as isoformas de COX (indometacina), bloqueando desta maneira duas vias de vasodilatação do animal, restando à ele apenas, a vasodilatação via NOS. Contudo, logo após a administração de indometacina, houve uma dificuldade de estabilização pressão arterial, inviabilizando a análise da resposta vascular após o tratamento. Uma próxima etapa, que está sendo planejada, consiste na administração de outros inibidores da COX (alguns seletivos), associados aos inibidores dos SK_{Ca} e IK_{Ca} .

Devido à este fato, estudamos a resposta da inibição seletiva apenas da via de vasodilatação mediada por canais de potássio. A administração de Apamina e TRAM-34 não resultou em alteração na pressão arterial média entre os grupos ligadura e falso-operado. Porém, após o tratamento com os inibidores, pode-se observar uma redução do tempo de vasodilatação mediada por acetilcolina no grupo ligadura na dose de 30 nmol/Kg. Este resultado sugere que os SK_{Ca} e IK_{Ca} , de localização predominantemente endotelial, apresentam uma maior importância em um quadro de periodontite experimental vinte e um dias após a indução do processo inflamatório, compensando o prejuízo da resposta vasodilatadora dependente de endotélio.

Ao longo dos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem agregando informações sobre as alterações causadas pela periodontite. Estas informações foram obtidas experimentalmente em vários tempos, e por diferentes experimentadores, e estão descritas cronologicamente na figura 21. Por meio desta figura é possível compreender o questionamento do presente trabalho em relação à existência de um possível mecanismo compensatório diante à diminuição da produção de NO causada pela indução da periodontite.

Figura 21: Cronologia das alterações causadas pela indução da periodontite observadas pelo nosso grupo de trabalho.



Vários de nossos trabalhos demonstram temporalmente as alterações causadas pela periodontite. Sete dias após a colocação das ligaduras: observa-se a presença de uma perda óssea alveolar, característica da periodontite. Quatorze dias após a colocação das ligaduras: observa-se uma perda óssea alveolar, associada à presença de uma inflamação sistêmica, inflamação vascular, redução da produção de NO, e consequente diminuição da vasodilatação dependente de endotélio. Vinte e um dias após a colocação das ligaduras: observa-se uma perda óssea alveolar, associada à presença de

uma inflamação sistêmica, inflamação vascular, redução da produção de NO, porém, nota-se um reestabelecimento da vasodilatação dependente de endotélio, possivelmente devido à presença de um mecanismo compensatório de vasodilatação.

- Os animais mesmo com sinais indicativos de periodontite, não apresentaram disfunção endotelial vinte e um dias após a indução do processo inflamatório.;

- A inibição de NOS, COX e a utilização de um inibidor não seletivo dos canais de potássio, não evidenciou uma alteração da resposta vasodilatadora, mas sim no tempo de vasodilatação do grupo ligadura, sugerindo alguma alteração na resposta vascular destes animais diante a inibição das três principais vias de vasodilatação.

- O estudo isolado de cada via não resultou em alteração da resposta vasodilatadora, tampouco do tempo de relaxamento do vaso, provavelmente pelo fato de a célula poder contar com outras duas vias de vasodilatação.

- A inibição não seletiva da COX associada à inibição não seletiva dos canais de potássio também não resultou em alterações na redução da pressão arterial média e do tempo de vasodilatação.

- A administração de inibidores seletivos de SK_{Ca} e IK_{Ca} resultou em uma diminuição do tempo da resposta vasodilatadora dependente de endotélio, sugerindo uma importância destes canais na célula endotelial durante a doença periodontal.

- Uma opção interessante para os próximos experimentos é a avaliação da redução da pressão arterial média, e do tempo de vasodilatação antes e depois da administração de Apamina e TRAM-34 associados à diferentes inibidores da COX, e até mesmo com a associação de LNAME.

9. REFERÊNCIAS

AMAR, S.; GOKCE, N.; MORGAN, S.; LOUKIDELI, M.; VAN DYKE, T. E.; VITA, J. A. Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 2, n. 7, p. 1245-1249, 2003;

ANDRUKHOV, O.; HARIRIAN, H.; BERTL, K.; RAUSCH, W-D.; BANTLEON, H-P.; MORITZ, A.; RAUSCH-FAN, X. Nitric oxide production, systemic inflammation and lipid metabolism in periodontitis patients: possible gender aspect. **J Clin Periodontol.** v. 40, n. 10, p. 916-23, 2013;

BAHEKAR, A. A.; SINGH, S.; SAHA, S.; MOLNAR, J.; ARORA, R. The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. **Am Heart J.** v. 154, n. 5, p. 830-837, 2007;

BARTOLD, P. M.; CANTLEY, N. D.; HAYNES, D. R. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. **Periodontol 2000.** v. 53, p. 55–69, 2010;

BELIBASAKIS, G. N.; MEIER, A.; GUGGENHEIM, B.; BOSTANCI, N. The RANKL–OPG system is differentially regulated by supragingival and subgingival biofilm supernatants. **Cytokine.** n. 55, p. 98–103, 2011;

BONNET, S.; ARCHER, S. L. Potassium channel diversity in the pulmonary arteries and pulmonary veins: implications for regulation of the pulmonary vasculature in health and during pulmonary hypertension. **Pharmacol Ther.** v. 115, n.1, p.56-69, 2007;

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature.** v. 423, n. 6937, p. 337-342, 2003.

BRITO, L. C. W.; DALBÓ, S.; STRIECHEN, T. M.; FARIAS, J. M.; OLCHANHESKI JR, L. R.; MENDES, R. T.; VELLOSA, J. C. R.; FÁVERO, G. M.; SORDI, R.; ASSREUY, J.; SANTOS, F. A.; FERNANDES, D. Experimental periodontitis

promotes transient vascular inflammation and endothelial dysfunction. **Arch Oral Biol.** v. 58, p. 1187-1198, 2013;

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J Periodontol.** v. 79, n. 8 (Suppl), p. 1569-1576; 2008;

COTTI, E.; DESSI, C.; PIRAS, A.; MERCURO, G. Can a chronic dental infection be considered a cause of cardiovascular disease? A review of the literature. **Int J Cariol.** v. 148, n. 1, p. 4-10, 2011;

DALSGAARD, T.; KROIGAARD, C.; SIMONSEN, U. Calcium-activated potassium channels – a therapeutic target for modulating nitric oxide in cardiovascular disease? **Expert Opin Ther Targets.** v. 14, n.8, p. 825-837, 2010;

DE ARAÚJO JR. F.; SOUZA, T. O.; DE MEDEIROS, C. A.; DE SOUZA L. B.; FREITAS, M. D. E. L.; DE LUCENA, H. F.; DO SOCORRO COSTA FEITOSA ALVES, M.; DE ARAÚJO, A. A. Carvedilol Decrease IL-1 β and TNF- α , Inhibits MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL Expression, and Up-Regulates OPG in a Rat Model of Periodontitis. **PLoS One.** v. 8, n. 7, 2013;

DUMITRESCU, A. L.; ABD-EL-ALEEM, S.; MORALES-AZA, B.; DONALDSON, L. F. A. model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. **J Clin Periodontol.** v. 31, n. 8, p. 596-603, 2004;

EKUNI, D.; TOMOFUJI, T.; SANBE, T.; IRIE, K.; AZUMA, T.; MARUYAMA, T.; TAMAKI, N.; MURAKAMI, J.; KOKEGUCHI, S.; YAMAMOTO, T. Periodontitis-induced lipid peroxidation in rat descending aorta is involved in the initiation of atherosclerosis. **Periodontal Res.** v. 44, n. 4, p. 434-442, 2009;

EKUNI, D.; TOMOFUJI, T.; IRIE, K.; KASUYAMA, K.; UMAKOSHI, M.; AZUMA, T.; et al. Effects of periodontitis on aortic insulin resistance in an obese rat model. **Lab Invest.** v. 90, p. 348–359, 2010;

FOUDI, N.; LOUEDEC, L.; CACHINA, T.; BRINK, C.; NOREL, X. Selective cyclooxygenase-2 inhibition directly increases human vascular reactivity to norepinephrine during acute inflammation. **Cardiovasc Res.** v. 81, p. 269-277, 2009;

FUJIWARA, H.; WAKE, Y.; HASHIKAWA-HOBARA, N.; MAKINO, K.; TAKATORI, S.; ZAMAMI, Y.; KITAMURA, Y.; KAWASAKI, H. Endothelium-derived relaxing factor-mediated vasodilation in mouse mesenteric vascular beds. **J Pharmacol Sci.** v. 118, p. 373-381, 2012;

GIACHINI, F. R.; CARNEIRO, F. S.; LIMA, V. V.; CARNEIRO, Z. N.; DORRANCE, A.; WEBB, R. C.; TOSTES, R. C. Upregulation of intermediate calcium-activated potassium channels counterbalance the impaired endothelium-dependent vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Transl Res.** v. 154, n. 4, p.183-193, 2009;

GOES, P.; MELO, I. M.; SILVA, L. M.; BENEVIDES, N. M.; ALENCAR, N. M.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, V. Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. **J Periodontal Res.** v. 49, n. 1, p. 45-54, 2014;

GROSSER, T.; YUSUFF, S.; CHESKIS, E.; PACK, M.; FITZGERALD, G. A. Developmental expression of functional cyclooxygenases in zebrafish. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 99, p. 8418–8423, 2002;

HAYNES, W. G.; STANFORD, C. Periodontal Disease and Atherosclerosis: From Dental to Arterial Plaque. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** n. 23, p. 1309-1311, 2003;

HIGASHI, Y.; GOTO, C.; JITSUIKI, D.; UMEMURA, T.; NISHIOKA, K.; HIDAKA, T.; TAKEMOTO, H.; NAKAMURA, S.; SOGA, J.; CHAYAMA, K.; YOSHIZUMI, M.; TAGUCHI, A. Periodontal infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients. **Hypertension.** v. 51, n.2, p. 446-453, 2008;

HIGASHI, Y.; GOTO, C.; HIDAKA, T.; SOGA, J.; NAKAMURA, S.; FUJII, Y.; HATA, T.; IDEI, N.; FUJIMURA, N.; CHAYAMA, K.; KIHARA, Y.; TAGUSHI, A. 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;

HILGERS, R. H. P.; TODD JR., J.; WEBB, R. C. Regional heterogeneity in acetylcholine-induced relaxation in rat vascular bed: role of calcium-activated K⁺ channels. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 291, p. 216–222, 2006;

JANKET, S. J.; BAIRD, A. E.; CHUANG, S. K.; JONES J. A. Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 95, n.5, p. 559-569, 2003;

KHADER, Y. S.; ALBASHAIREH, Z. S.; ALOMARI, M. A. Periodontal diseases and the risk of coronary heart and cerebrovascular diseases: a meta-analysis. **J Periodontol**. v.75, n.8, p. 1046-1053, 2004;

KIMURA, S.; NAGAI, A.; ONITSUKA, T.; KOGA, T.; FUJIWARA, T.; KAYA, H.; AMADA, S. Induction of experimental periodontitis in mice with *Porphyromonas gingivalis* – adheres ligaturas. **J Periodontol**. v. 71, p. 1167-1173, 2000;

LOOS, B. G.; CRAANDIJK, J.; HOEK, F. J.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER VELDEN, U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. **J Periodontol**. v. 71, p. 1528-1534, 2000;

MA, S.; GUO, J.; YOU, X.; XIA, W.; YAN, F. Expressions of interleukin- 1 β and interleukin-6 within aortas and uteri of rats with various severities of ligature-induced periodontitis. **Inflammation**. v. 34, p. 260-268, 2011;

MACHADO, W. M.; PRESTES, A. P.; COSTA, T. P.; MENDES, R. T.; OLSCHANESKI JR, L. R.; SORDI, R.; OTUKI, M. F.; FAVERO ,G. M.; VELLOSO, J. C. R.; Santos, F. A.; FERNANDES, D. The effect of simvastatin on systemic

inflammation and endothelial dysfunction induced by periodontitis. **J Periodont Res.** doi: 10.1111/jre.12145. [Epub ahead of print], 2014;

MENDES, R. T.; SORDI, R.; OLCANHESKI JR, L. R.; MACHADO, W. M.; STANCZYK, C. P.; ASSREUY, J. ; SANTOS, F. A. ; FERNANDES, D. Periodontitis increases vascular cyclooxygenase-2: potential effect on vascular tone. **J Periodont Res.** v. 49, n.1, p. 85-92, 2014;

MERCANOGLU, F.; OFLAZ, H.; ÖZ, O.; GÖKBUGET, A. Y.; GENCHELLAC, H.; SEZER, M.; NISANCI, Y.; UMMAN, S. Endothelial Dysfunction in patients with chronic periodontitis and its improvement after initial periodontal therapy. **J Periodontol.** v. 75, n. 12, p. 1694-1700, 2004;

MISHRA, R. C.; TRIPATHY, S.; DESAI, K. M.; QUEST, D.; LU, Y.; AKHTAR, J. Nitric Oxide Synthase Inhibition Promotes Endothelium-Dependent Vasodilatation and the Antihypertensive Effect of L-Serine. **Hypertension.** v. 51, p. 791-796, 2008;

NAGASAWA, T.; KI J I, M.; YASHIRO, R.; HORMDEE, D.; HE, L.; KUNZE, M.; SUDA, T.; KOSHY G.; KOBAYASHI, H.; ODA, S.; NITTA, H.; ISHIKAWA, I. Roles of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. **Periodontol 2000.** v. 43, p. 65–84, 2007;

NELSON, M.T.; QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am J Physiol.** 268:C799-822; 1995;

NG, C. F.; KOON, C. M.; CHEUNG, D. W. S.; LAM, M. Y.; LEUNG, P. C.; LAU, C. B. S.; FUNG, K. P. The anti-hypertensive effect of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) and Gegen (*Pueraria lobata*) formula in rats and its underlying mechanisms of vasorelaxation. **J Ethnopharmacol.** v.137, p. 1366– 1372, 2011;

OLTEANU, M.; ȘURLIN, P.; OPREA, B.; RAUTEN, A.; POPESCU, R. M.; NIȚU, M.; CAMEN, G.; CARAIVAN, O. Gingival inflammatory infiltrate analysis in patients with chronic periodontitis and diabetes mellitus. **Rom J Morphol Embryol.** v. 52, n. 4, p. 1311–1317, 2011;

OHTA, H.; WADA, H.; NIWA, T.; KIRII, H.; IWANOTO, N.; FUJII, H. Disruption of tumor necrosis factor- α gene diminishes the development of atherosclerosis in Apo-E-deficient mice. **Atheroscler.** v. 180 p. 11-17, 2005;

PAIZAN, M, L.; MARTIN, J. F. V. Associação entre doença periodontal, doença cardiovascular e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens.** v. 16, n. 3. p. 183-185, 2009;

PIMENTEL, S. P.; BARRELLA, G. E.; CASARIN, R. C.; CIRANO, F. R.; CASATI, M. Z.; FOGGIO, M. A.; FIGUEIRA, G. M.; RIBEIRO, F. V. Protective effect of topical *Cordia verbenacea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays. **BMC Complement Altern Med.** v. 21 p. 224, 2012;

POREDOS, P.; JEZOVIK, M. K. J. Testing endothelial function and its clinical relevance. **Atheroscler Thromb.** v. 20, n. 1, p. 1-8, 2013;

QUYYUMI, A. A. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. **Am J Med.** v. 105, n. 1, p. 32-39, 1998;

RAMLI, J.; CALDERONARTERO, P.; BLOCK, R. C.; MOUSA, S. A. Novel therapeutic targets for preserving a healthy endothelium: strategies for reducing the risk of vascular and cardiovascular disease. **Cardiol J.** v. 18, n. 4, p. 352-363, 2011;

RENVERT, S.; PERSSON, G. R. A systematic review on the use of residual probing depth, bleeding on probing and furcation status following initial periodontal therapy to predict further attachment and tooth loss. **J Clin Periodontol.** v. 29, n. 3, p. 82-89, 2002;

SALVEMINI, D.; KIM, S. F.; MOLLACE, V. Reciprocal regulation of the nitric oxide and clinical implications cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance Reciprocal. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 304, p. 473-487, 2013;

SHIMOKAWA, H.; YASUTAKE, H.; FUJII, K.; OWADA, M.K.; NAKAIKE, R.; FUKUMOTO, Y.; TAKAYANAGI, T.; NAGAO, T.; EGASHIRA, K.; FUJISHIMA, M.; TAKESHITA, A. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 28, n. 5, p. 703-711, 1996;

SITIA, S.; TOMASONI, L.; AZTENI, F.; AMBROSIO, G.; CORDIANO, C.; CATAPANO, A. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. **Autoimmun Ver.** v. 9, n.12, p. 830-834, 2010;

SORDI, R.; FERNANDES, D.; HECKERT, B. T.; ASSREUY, J. Early potassium channel blockade improves sepsis-induced organ damage and cardiovascular dysfunction. **Brit J Pharmacol.** v. 163, p. 1289–1301, 2011;

TAKIMOTO, E. Cyclic GMP-Dependent Signaling in Cardiac Myocytes. **Circ J.** v. 76, p. 1819–1825, 2012;

TAN, K. C. B.; CHOW, W-S.; AI, V. H. G.; LAM, K. S. L. Effects of angiotensin II receptor antagonist on endothelial vasomotor function and urinary albumin excretion in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. **Diabetes Metab Res Ver.** v. 18, n. 1, p. 71-76, 2002;

TONETTI, M. S.; D'AIUTO, F.; NIBALI, L.; DONALD, A.; STORRY, C.; PARKAR, M.; SUVAN, J.; HINGORANI A. D.; VALLANCE P.; DEANFIELD J. Treatment of periodontitis and endothelial function. **N Engl J Med.** v. 356, n. 9, p. 911-920, 2007;

TSIOUFIS, C.; KASIAKOGLAS, A.; THOMOPOULOS, C., STEFANADIS, C.
Periodontitis and blood pressure: the concept of dental hypertension.

Atherosclerosis. v. 219, n.1, p. 1-9, 2011;

VERSARI, D.; DAGHINI, E.; VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; TADDEI, S. Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. **Diabetes Care.** v. 32, n. 2, p. 314-421, 2009.

WILLIAMS, T. J.; PECK, M. J. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. **Nature.** v. 270, n. 5637, p. 530-2, 1977;

ANEXO 1 - CARTA DE APROVAÇÃO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UEPG



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

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

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 019/2013

Protocolo UEPG – 21142/2013

Título – “Estudo das vias de sinalização celular envolvidas na vasodilatação dependente de endotélio”.

Interessado – Prof. Dr. Fábio André dos Santos

Data de Entrada – 15/08/2012

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 15/08/2012 a 15/08/2014

Considerações

Prezado Professor,

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação pela aprovação, por dois anos, do uso de 60 (sessenta) animais

- APROVADO.

Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Divisão de Pesquisa

Prof. Dr. Giovanni Marino Favero
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

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

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