

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E
BIOCIÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA

WILLIAN MOREIRA MACHADO

**O EFEITO DA SINVASTATINA EM ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E
NA PERDA ÓSSEA INDUZIDA PELA PERIODONTITE**

PONTA GROSSA

2013

WILLIAN MOREIRA MACHADO

**O EFEITO DA SINVASTATINA EM ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E
NA PERDA ÓSSEA INDUZIDA PELA PERIODONTITE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes

PONTA GROSSA

2013

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

M149 Machado, Willian Moreira
O efeito da sinvastatina em alterações
cardiovasculares e na perda óssea induzida
pela periodontite/ Willian Moreira
Machado. Ponta Grossa, 2013.
75f.

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

Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes.

1.Periodontite. 2.Inflamação sistêmica.
3.Disfunção endotelial. 4.Sinvastatina.
I.Fernandes, Daniel. II. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Ciências Farmacêuticas. III. T.

CDD: 615.1



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. 07/2013

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO, DO PÓS-GRADUANDO WILLIAN MOREIRA MACHADO, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, REALIZADA NO DIA 22 DE FEVEREIRO DE 2013, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao vigésimo segundo dia do mês de fevereiro de dois mil e treze, às 15 h, no Auditório do CIPP da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Prof. Dr. Daniel Fernandes, em sessão fechada, reuniu-se a banca examinadora para a defesa de dissertação do pós-graduando Willian Moreira Machado. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia. Linha de Pesquisa: Desenvolvimento e controle de fármacos, medicamentos e correlatos. A banca foi constituída pelos pesquisadores: Prof. Dr. Daniel Fernandes (Presidente) / UEPG, Prof. Dr. Michel Fleith Otuki / UEPG e Profa. Dra. Juliana G. Chichorro / UFPR, 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 **“O efeito da sinvastatina em alterações cardiovasculares e na perda óssea induzidas pela periodontite”**.

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 a presente ata que vai assinada pelos membros da banca examinadora e por mim, Rubyan Lucas Santos Piazzetta, [assinatura], secretário do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela UEPG. Ponta Grossa, 22 de fevereiro de 2013.

Observação (se necessária):

[assinatura]
Prof. Dr. Daniel Fernandes

[assinatura]
Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

[assinatura]
Profa. Dra. Juliana G. Chichorro

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Daniel Fernandes pela incansável dedicação, paciência e apoio em todos os momentos.

Ao Professor Doutor Fábio André dos Santos por disponibilizar o seu laboratório e equipamentos para realização dos experimentos de periodontite.

Ao Professor Doutor José Carlos Rebuglio Velloso e sua aluna Francine Alessandra Manente, pelo auxílio com os exames bioquímicos dos animais em estudo no Laboratório Escola da Universidade Estadual de Ponta Grossa (LUAC), como também por disponibilizar seu laboratório para realização de experimentos.

Ao Professor Doutor Edmar Miyoshi e sua aluna Débora Dalla Vecchia, pelo auxílio com o experimento de Campo Aberto dos animais em estudo.

Ao Professor Doutor Everson Augusto Krum, Professor Mestre Paulo Fávero pela oportunidade de realização de Estágio em Docência no Laboratório Escola da Universidade Estadual de Ponta Grossa (LUAC).

A Mestre Lorena Christine Wiecheteck de Brito, Bioquímica do Laboratório Oscar Pereira, pela realização e ajuda nos exames hematológicos.

As funcionárias do Biotério, Maria e Marilene, pela disponibilidade em auxiliar no manejo e alimentação dos animais.

Ao Auxiliar Técnico Márcio, do Laboratório Escola da Universidade Estadual de Ponta Grossa (LUAC), pelo auxílio no manejo de equipamentos e também na realização de exames hematológicos.

A equipe de trabalho do Professor Doutor Daniel Fernandes, a Mestre Reila Tainá Mendes, as alunas de Iniciação Científica Tatiane Perina Costa e Ana Paula Prestes e principalmente o Mestrando Luiz Renato Olchanheski Júnior, pela incansável ajuda e apoio durante os dois anos de trabalho.

A Capes, CNPq e Fundação Araucária, pela bolsa e apoio financeiro.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e a Universidade Estadual de Ponta Grossa pela oportunidade em realizar o Mestrado nesta Instituição.

Aos familiares e amigos que estiveram presentes, em especial a Athena Faoro Baron, que me incentivou a realizar mais esta etapa profissional.

E ao Senhor Deus, por nos dar a oportunidade da vida e proteção para a realização desse trabalho.

RESUMO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica iniciada e perpetuada por bactérias anaeróbicas Gram-negativas que colonizam a área subgengival. Esta doença é caracterizada pela destruição do tecido periodontal de inserção, reabsorção óssea, infiltração de leucócitos e formação de bolsa periodontal. Estudos mostram um aumento significativo do risco de doenças cardiovasculares, principalmente aterosclerose e hipertensão, entre pessoas com periodontite. Acredita-se que a inflamação sistêmica induzida pela doença periodontal e a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico seriam a causa da disfunção endotelial, que consequentemente leva a doenças cardiovasculares. Interessantemente, estudos mostram que as estatinas vêm proporcionando resultados consistentes e satisfatórios na reversão da disfunção endotelial. Assim, a proposta deste trabalho foi avaliar o efeito da administração sistêmica da sinvastatina sobre parâmetros inflamatórios de periodontite induzida e correlacionar suas possíveis ações no sistema cardiovascular e na perda óssea alveolar. Ratos *Wistar* foram submetidos a indução da periodontite através da colocação de ligaduras ou eram submetidos a falsa-cirurgia (as ligaduras eram colocadas e imediatamente removidas). No dia 8, os animais foram novamente randomizados para receber o tratamento com a sinvastatina (10 mg/kg/dia v.o.) ou veículo. Durante o experimento, nos dias 1, 7 e 14 os ratos eram preparados para análise da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca. E no dia 14, os ratos foram preparados para análise de parâmetros cardiovasculares, perfil lipídico, marcadores inflamatórios sistêmicos e de lesão tecidual. A maxila e a mandíbula eram retiradas para a análise da perda óssea. Nossos dados mostram que os animais com periodontite não tratados apresentaram uma resposta vasodilatadora endotélio-dependente (acetilcolina) reduzida, uma característica da disfunção endotelial em animais com doença periodontal. Em contrapartida, foi encontrada uma resposta vasodilatadora aumentada em animais com periodontite tratados com sinvastatina. As alterações vasculares induzidas pelo tratamento com sinvastatina foram associadas com uma diminuição do perfil lipídico, linfocitário e marcadores inflamatórios como IL-6 e proteína C-reativa, que são tradicionalmente associados com o risco cardiovascular. E interessantemente, a sinvastatina diminuiu a perda óssea alveolar nos animais com periodontite. Nossos dados mostram que a sinvastatina reduz a perda óssea alveolar, inflamação sistêmica e o dano ao endotélio induzidos pela periodontite. Desta forma, a sinvastatina pode ser considerada uma droga promissora para o tratamento da doença periodontal e prevenção de complicações cardiovasculares.

Palavras-chave: Periodontite, Inflamação Sistêmica, Disfunção Endotelial, Sinvastatina

ABSTRACT

Periodontitis is a chronic inflammatory disease initiated and perpetuated by Gram-negative anaerobic bacteria that colonize the subgingival area. This disease is characterized by destruction of periodontal tissue insertion, bone resorption, leukocyte infiltration and formation of periodontal pockets. Studies show a significantly increased risk of cardiovascular disease, especially atherosclerosis and hypertension, among people with periodontitis. It is believed that systemic inflammation induced by periodontal disease and decreased nitric oxide bioavailability would cause endothelial dysfunction, which consequently leads to cardiovascular disease. Interestingly, studies show that statins that has been providing consistent and satisfactory results in reversal of endothelial dysfunction. Thus, the purpose of this study was to evaluate the effect of systemic administration of simvastatin on inflammatory parameters induced periodontitis and correlate their possible actions in the cardiovascular system and in alveolar bone loss. *Wistar* rats were subjected to induction of periodontitis by placement of ligatures or were subjected to false-surgery (the ligatures were immediately placed and removed). On day 8, the animals were randomized to treatment with simvastatin (10 mg/kg/day p.o.) or vehicle. During the experiment, on days 1, 7 and 14 the rats were prepared for analysis of systolic blood pressure and heart rate. And on day 14, the rats were prepared for analysis of cardiovascular parameters, lipid profile, systemic inflammatory markers and tissue injury. The maxilla and mandible were removed for analysis of bone loss. Our data show that animals with untreated periodontitis showed an endothelium-dependent vasodilator response (acetylcholine) reduced a characteristic of endothelial dysfunction in animals with periodontal disease. In contrast, we found an increased vasodilatory response in animals with periodontitis treated with simvastatin. The vascular changes induced by treatment with simvastatin were associated with a decrease in lipid profile, and lymphocytic inflammatory markers such as IL-6 and C-reactive protein, which are traditionally associated with cardiovascular risk. And interestingly, simvastatin decreased alveolar bone loss in animals with periodontitis. Our data show that simvastatin reduces alveolar bone loss, systemic inflammation and damage to the endothelium induced periodontitis. Thus, simvastatin can be considered a promising drug for the treatment of periodontal disease and prevention of cardiovascular complications.

Keywords: Periodontitis, Systemic Inflammation, Endothelial Dysfunction, Simvastatin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Representação esquemática do efeito da inflamação sistêmica decorrente da periodontite sobre a célula endotelial.....	15
Figura 2.	Mecanismos moleculares das estatinas independentes da inibição da HMG-CoA redutase.....	23
Figura 3.	Colocação das ligaduras nos ratos.....	27
Figura 4.	Fotos da mandíbula e maxila de ratos preparados para mensuração da perda óssea.....	30
Figura 5.	Representação cronológica do experimento.....	35
Figura 6.	Efeito da periodontite induzida pela colocação de ligadura sobre a alimentação e peso dos animais.	37
Figura 7.	Efeito da sinvastatina sobre o comportamento físico do animal.....	39
Figura 8.	Avaliação de um marcador sérico de lesão muscular.....	40
Figura 9.	Efeito da sinvastatina sobre a perda óssea alveolar média (mm) na maxila e na mandíbula nos ratos submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.....	42
Figura 10.	Perfil lipídico em um modelo experimental de periodontite.....	44
Figura 11.	Análise de componentes sanguíneos (série branca) em um modelo experimental de periodontite.....	46
Figura 12.	Efeito da sinvastatina em marcadores inflamatórios (IL-6 e PCR).....	48
Figura 13.	Efeito da sinvastatina sobre a queda de pressão arterial média induzida pela acetilcolina e pelo nitroprussiato de sódio em ratos submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.....	50
Figura 14.	Efeito da sinvastatina sobre a pressão arterial média, frequência cardíaca, sistólica e diastólica basal.....	51
Figura 15.	Efeito temporal da periodontite e da sinvastatina sobre a pressão arterial média sistólica e frequência cardíaca (mmHg).....	52

TABELA

TABELA 1.	Propriedades farmacológicas dos inibidores de hidroximetilglutaril-CoAredutases.....	18
TABELA 2.	Quantificação dos componentes sanguíneos dos respectivos grupos do experimento.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DCVs – doenças cardiovasculares

LPS – lipopolissacarídeo bacteriano

EROS – espécies reativas de oxigênio

PCR – Proteína C reativa

ET-1 – Endotelina-1

ROCK – Rho quinases

GGPP – geranylgeranyl pirofosfato

GDP – guanina dinucleotídeo fosfato

BMP-2 – proteína morfogenética óssea 2

OPG – osteoprotegerina

HMG-CoA redutase – Hidróxi-metil-glutaril Coenzima-A redutase

FPP – farnesil pirofosfato

COX-2 – cicloxigenase-2

PGI₂ - prostaciclina I₂

NADPH oxidase – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

GTP – guanosina trifosfato

Akt – serina/treonina quinase

NO – óxido nítrico (do Inglês *nitric oxide*)

LDL-ox – Lipoproteína de baixa densidade oxidada (do Inglês *oxidized low density lipoprotein*)

LDL – Lipoproteína de baixa densidade (do Inglês *low density lipoprotein*)

TNF- α - Fator de necrose tumoral (do Inglês *tumor necrosis factor-alpha*)

PAI-1 - ativador de plasminogênio-1 (do inglês *plasminogen activator-1*)

ICAM-1 – Moléculas de adesão intercelular-1 (do Inglês *intercellular adhesion molecules-1*)

VCAM – Moléculas de adesão vascular-1 (do Inglês *vascular adhesion molecules*)

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial (do Inglês *endothelial nitric oxide synthase*)

NOS – óxido nítrico sintase (do Inglês *nitric oxide synthase*)

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal (do Inglês *neuronal nitric oxide synthase*)

iNOS-2 – óxido nítrico sintase induzida (do Inglês *induced nitric oxide synthase*)

VLDL – lipoproteínas de densidade muito baixa (do Inglês *very low density lipoprotein*)

cGMP – monofosfato cíclico de guanosina (do Inglês *cyclic guanosine monophosphate*)

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro (do Inglês *messenger ribonucleic acid*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. PROPOSIÇÃO.....	25
2.1.OBJETIVOS GERAIS.....	25
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1.ANIMAIS.....	26
3.2.COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS.....	26
3.3.INDUÇÃO DA PERIODONTITE ATRAVÉS DE LIGADURAS.....	26
3.4.AVALIAÇÃO DA LIGADURA NO PESO E NA ALIMENTAÇÃO DOS RATOS.....	28
3.5.TESTE DE CAMPO ABERTO.....	28
3.6.MENSURAÇÃO DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR – Exame Morfométrico.....	29
3.7.QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES.....	30
3.7.1. AVALIAÇÃO DE MARCADOR DE LESÃO MUSCULAR.....	30
3.7.2. AVALIAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO E HEMATOLÓGICO.....	31
3.7.3. AVALIAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS.....	31
3.8.MENSURAÇÃO DE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES.....	31
3.9.PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	33
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1.CONSUMO DE RAÇÃO E AVALIAÇÃO DO PESO DOS RATOS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE – CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA LIGADURA NA ALIMENTAÇÃO E PESO.....	37
5.2.TESTE DE CAMPO ABERTO E QUANTIFICAÇÃO DA CREATINA QUINASE CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA SINVASTATINA SOBRE LESÃO DO MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	38
5.3.PERDA ÓSSEA ALVEOLAR MÉDIA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE – CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA SINVASTATINA.....	41
5.4.PERFIL LIPÍDICO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE -	

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SINVASTATINA.....	43
5.5. QUANTIFICAÇÃO DE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS SISTÊMICOS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE – AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SINVASTATINA.....	45
5.6. PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE – CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA SINVASTATINA.....	49
6. DISCUSSÕES.....	53
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
8. REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

A saúde bucal continua a ser um dos maiores problemas de saúde pública em todo o mundo, e apesar dos grandes avanços na compreensão, prevenção e tratamento que ocorreram nas últimas décadas, doenças bucais comuns como gengivite e periodontite ainda figuram entre as doenças microbianas mais prevalentes da humanidade (PUSSINEN et al., 2007). Dessa forma a boca representa um contribuinte expressivo tanto para carga total de infecção como de inflamação, e, portanto, para o bem estar e saúde geral de um indivíduo.

Esta relação entre saúde bucal e saúde geral tem sido caracterizada nas duas últimas décadas e numerosos estudos epidemiológicos têm relacionado uma saúde bucal precária com doenças cardiovasculares (DCVs), controle glicêmico inadequado e nascimento de bebês prematuros de baixo peso, além de outras doenças como artrite reumatóide e osteoporose (DEMMER et al., 2008; KIM E AMAR, 2006). A relação entre saúde bucal e a condição geral tornou-se, portanto, um importante objeto de estudo.

Atualmente está bem estabelecido que as DCVs são responsáveis por aproximadamente 40% das mortes em todo o mundo, mas os fatores de risco chamados clássicos não justificam todas as DCVs, principalmente entre os adultos jovens (PAQUETTE, BRODALA, NICHOLS, 2007; SEYMOUR et al., 2009). Os fatores de risco são a chave para prevenção, e experiências prévias têm mostrado que até mesmo uma modesta mudança no risco pode gerar uma expressiva mudança nos índices negativos da doença. Portanto, entender

todos os fatores de risco possíveis é fundamental para que se possa reduzir a morbidade e mortalidade de DCVs.

A periodontite é uma doença inflamatória crônica iniciada e perpetuada por um pequeno grupo de bactérias anaeróbicas Gram-negativas que colonizam a área subgengival (PAGE, KORNMAN, 1997). Esta doença é caracterizada pela destruição do tecido periodontal de inserção, reabsorção óssea, infiltração de leucócitos e formação de bolsa periodontal. A inflamação decorrente da periodontite parece afetar não somente os tecidos bucais, mas tem repercussão sistêmica no organismo (LAMSTER et al., 2008).

Contínuos estudos observacionais demonstraram um aumento significativo de DCVs entre pessoas com periodontite (HUNG et al., 2003; TONETTI et al., 2007). Fica a questão, no entanto, se a doença periodontal é um fator de risco para doença cardiovascular ou apenas contribui para o processo (HIGASHI et al., 2008; EKUNI et al., 2009). É importante lembrar que a doença periodontal e as DCVs comungam de alguns mesmos fatores de risco, como idade avançada, gênero masculino, tabagismo e diabetes (LI et al., 2002; GIBSON et al., 2004; DEMMER, DESVARIEUX, 2006).

Alguns estudos têm mostrado que na infecção periodontal, o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e demais toxinas bacterianas são liberadas na corrente sanguínea, ocasionando uma resposta inflamatória sistêmica (CARRANZA et al., 2010). O sistema vascular tem papel primordial nessa fase, através do recrutamento de leucócitos e regulação do tônus e da permeabilidade vascular (DAUPHINEE, KARSA, 2006). Durante o processo inflamatório, o infiltrado de neutrófilos gera a produção de espécies reativas de

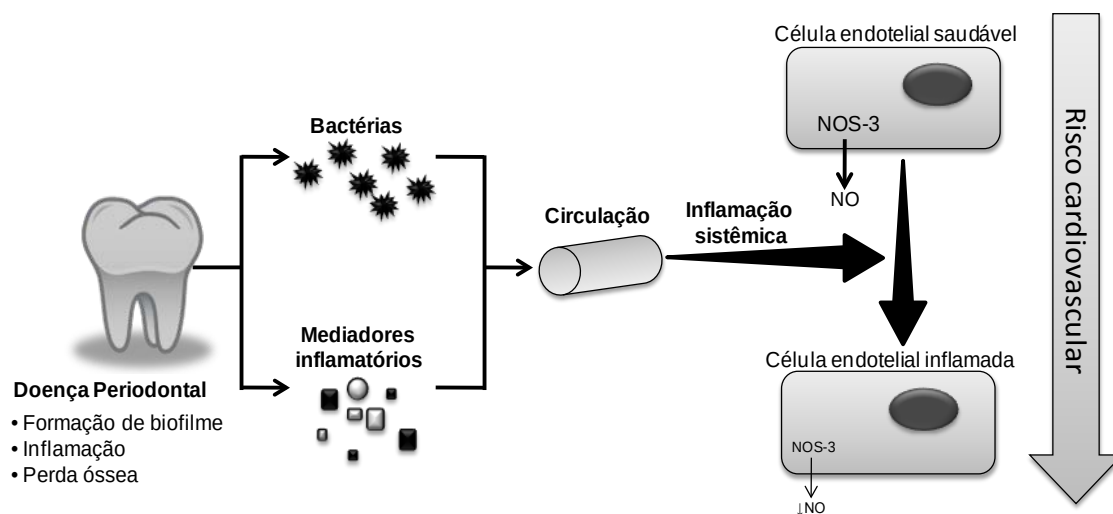
oxigênio (EROS) podendo gerar alterações vasculares. Este estresse oxidativo vascular pode se associar a uma diminuição na disponibilidade de óxido nítrico (NO) e ao desenvolvimento de hipertensão (TSIOUFIS et al., 2011).

O NO apresenta importantes propriedades anti-ateroscleróticas (ITURRY-YAMAMOTO, ALVES, PICON, 1997). A formação de NO pelo endotélio depende da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que converte o aminoácido L-arginina, na presença de oxigênio, em NO e L-citrulina. A produção de NO é mediada por três isoformas enzimáticas de NOS, a NOS-1, também chamada de neuronal (nNOS), a NOS-2, também conhecida como óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e finalmente a NOS-3, também chamada de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) pela presença marcante nestas células (RAFIKOV et al., 2011). Além de potente vasodilatador, o NO atua como inibidor da agregação plaquetária, proliferação de células musculares lisas e de moléculas de adesão celular (GANZ, VITA, 2003).

Alterações na produção e biodisponibilidade de NO estão associadas a diversas patologias tais como hipertensão, hipercolesterolemia, envelhecimento, diabetes e insuficiência cardíaca. O mecanismo responsável por estas alterações na fisiologia normal do endotélio são variados e multifatoriais (LANDMESSER et al., 2004). Existem diversas alterações potenciais que podem promover redução da vasodilatação endotélio-dependente incluindo mudanças na atividade e/ou expressão da enzima eNOS, redução da sensibilidade das células musculares lisas vasculares ao NO e/ou aumento da degradação de NO via reações com EROs (CAI, HARRISON, 2001).

Portanto, embora não seja totalmente definido o mecanismo pelo qual a doença periodontal é relacionada com DCVs, acredita-se que a inflamação sistêmica induzida pela microbiota presente na doença periodontal possa contribuir para o desenvolvimento de uma inflamação vascular, com consequente redução da produção e/ou biodisponibilidade do NO, gerando disfunção endotelial (Figura 1) – (EKUNI et al., 2009). Interessantemente, trabalhos recentes têm mostrado a presença de disfunção endotelial em pacientes com periodontite - (HIGASHI et al., 2008; HIGASHI et al., 2009; TONETTI et al., 2007; AMAR et al., 2003).

Figura 1. Representação esquemática do efeito da inflamação sistêmica decorrente da periodontite sobre a célula endotelial.



Fonte: O Autor.

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

e crescimento celular da parede vascular (CELERMAJER, 1997). Em humanos, a manifestação do fenótipo endotelial disfuncional ocorre anteriormente ao desenvolvimento do processo aterosclerótico e está diretamente associado aos fatores de risco cardiovasculares tradicionais, tais como hipercolesterolemia, hipertensão arterial, diabetes mellitus e também aos fatores de risco emergentes como a hiperhomocisteinemia, obesidade e inflamação sistêmica (STAPLETON et al, 2010; ESPER et al, 2006).

Múltiplas substâncias inflamatórias e/ou pró-trombóticas, originárias de processos inflamatórios crônicos ou agudos, provocam alterações na vasodilatação endotélio-dependente (HINGORANI et al., 2000). Ainda, fatores como lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox), LPS, Interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), proteína C reativa (PCR), moléculas de adesão celular (ICAM-1, VCAM-1), fator tecidual, inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1) e ciclooxigenase (COX-2), possuem a capacidade de ativar as células endoteliais podendo assim, produzir o fenótipo endotelial disfuncional (VERMA et al, 2003).

Esses mecanismos moleculares e celulares que correlacionam inflamação e disfunção endotelial ainda não se encontram totalmente esclarecidos (YUDKIN et al., 1999), mas acredita-se que há uma correlação direta com a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (SINISALO et al., 2000). Em culturas de células endoteliais, fatores pró-inflamatórios como TNF- α e PCR diminuem a produção endotelial deste mediador vasoativo (VALLANCE et al., 1997).

Atualmente, a PCR constitui um dos principais marcadores inflamatórios associados à disfunção endotelial. Trata-se de uma proteína plasmática de fase aguda sintetizada pelo fígado em resposta a estímulos inflamatórios mediados principalmente pela IL-6 (RIDKER et al., 2000). Atualmente, estes dois mediadores inflamatórios são considerados fatores de risco independente de infarto do miocárdio, morte vascular e aterosclerose, apresentando valor prognóstico superior à avaliação dos níveis de LDL (DANESH, PEPYS, 2009).

Estudos recentes investigam se o papel da PCR no processo inflamatório ocorre somente como um marcador ou apresenta um papel específico na patogênese da disfunção endotelial e sucessiva lesão aterosclerótica (PASCERI et al., 2000). Em níveis associados a risco cardiovascular, a PCR apresenta efeito direto no estímulo do processo aterosclerótico, incluindo o aumento da expressão de moléculas de adesão celular pelo endotélio (PASCERI et al., 2000; VENUGOPAL et al., 2002), produção de quimiocinas, e macrófagos relacionados a captura de LDL. Este mediador inflamatório modula diretamente a produção de fatores vasoativos derivados do endotélio, promovendo a redução da tradução de mRNA da eNOS como também alterando a sua estabilidade (VENUGOPAL et al., 2002).

Levando em conta as considerações acima, é lícito pensar que a reversão da disfunção endotelial, parcial ou total seria a providência mais importante para estabilizar o processo, restaurar a produção de NO e outros mediadores e assim prevenir cascatas inflamatórias, trombóticas e/ou ateroscleróticas. Diversos trabalhos já demonstraram a capacidade de tratamentos reverterem o dano ao endotélio, dentre eles terapias com antihipertensivos (JAVARONI, NEVES, 2011; ZEPEDA et al., 2012),

antidiabéticos (ASCHOFF et al., 2012; NAKA et al., 2012), polivitamínicos (RIMBAUD et al., 2011; SHAB-BIDAL et al., 2011) entre vários outros. Mas, interessadamente, é o tratamento com as estatinas que vem proporcionando resultados consistentes e satisfatórios na reversão da disfunção endotelial (LAUFS et al., 2000; LAUFS, U.; LIAO, J. K, 2003).

As estatinas constituem a classe de fármacos hipolipemiantes de maior prescrição na atualidade, sendo associadas com uma expressiva diminuição da morbidade e mortalidade de doenças cardiovasculares (BANACH et al., 2009), diferindo entre si basicamente quanto a sua lipofilicidade e tempo de meia-vida (Tabela 1) – (LLINGWORTH et al., 2001).

TABELA 1. Propriedades farmacológicas dos inibidores de hidroximetilglutaril-CoA redutases

Fármaco	Solubilidade	Dose usual (mg)	Metabolismo	Tempo de meia-vida (h)	Excreção renal (%)
Lovastatina	Lipofílica	20 – 80	CYP3A4	2 – 3	10
Sinvastatina	Lipofílica	10 – 80	CYP3A4	1 – 3	13
Pravastatina	Hidrofílica	10 – 40	Sulfatação	2 – 3	20
Fluvastatina	Lipofílica	20 – 80	CYP2C9	0,5 – 3	6
Atorvastatina	Lipofílica	10 – 80	CYP3A4	13 – 16	2
Rosuvastatina	Hidrofílica	10 – 40	CYP2C9	19	10

Fonte: O Autor.

Em 1971, Akio Endo iniciou o primeiro projeto com o objetivo de inibir a atividade da hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMGCoA redutase), enzima responsável pela síntese do colesterol. Os resultados conduziram a mevastatina um potente inibidor da síntese de colesterol, que chegou a testes em humanos, mas devido aos efeitos indesejados acabou não sendo comercializada (YAMMOTO, SUDO, ENDO, 2004). A partir de 1990, depois

dos avanços gerados pela descoberta da mevastatina, entraram no mercado três fármacos inibidores da HMGCoA redutase: lovastatina, sinvastatina e a pravastatina (ENDO, 2010).

O mecanismo de ação destes fármacos se fundamenta na inibição competitiva da conversão da HMG-CoA redutase em mevalonato, passo limitante da biossíntese do colesterol (HALCOX, DEANFIELD, 2004). O efeito resultante é o aumento da remoção de LDL circulante, redução da produção de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e de modo mais discreto a diminuição da concentração plasmática de triglicerídeos (NISSEN et al., 2004). Consequentemente, as estatinas também promovem a redução de intermediários isoprenóides como o geranilgeranil pirofosfato (GGPP) e farnesil pirofosfato (FPP), afetando desta forma o processo de isoprenilação de proteínas, indicando que os efeitos das estatinas vão além da redução do colesterol (STOCKINS, 2009). Neste sentido, um estudo clínico recente chamou a atenção, uma vez que a rosuvastatina reduziu significativamente a incidência de problemas cardiovasculares em pessoas aparentemente saudáveis, sem hiperlipidemia. De maneira interessante, todos os indivíduos que foram beneficiados pelo tratamento com a estatina apresentavam altos níveis de PCR (BRUNNER et al., 2005).

Estudos recentes sugerem que as estatinas apresentam diversos efeitos terapêuticos colesterol-independentes (JOHN et al., 2001) como o aumento da biodisponibilidade de NO, propriedades antioxidantes, imunomodulação, neuroproteção e senescência celular (CORSINI et al., 1999), dos quais muitos se devem a inibição da síntese de isoprenóides. Estes atuam como sinalizadores intracelulares, particularmente para GTPases de ligação as

proteínas Rho, Ras e Rac, cuja função é dependente de isoprenilação (KUREISHI et al., 2000). Estes efeitos são conhecidos como pleiotrópicos, que se caracterizam por atividades secundárias das estatinas não relacionadas diretamente ao seu mecanismo principal (LINARELLI, POTT Jr, 2008).

Devido à descoberta dos efeitos pleiotrópicos promovidos pelas estatinas, diversos estudos clínicos investigam a utilização desta classe de fármacos em condições patológicas relacionadas ou não aos níveis plasmáticos de LDL, tais como diabetes mellitus, hipertensão, aterosclerose (KON KOH, 2000), doença de Alzheimer (GRAMMAS, 2011), HIV, doença periodontal (DAVIGNON, LEITER, 2005), infecções crônicas e agudas (VLACHOPOULOS et al., 2007).

Um dos efeitos pleiotrópicos possíveis das estatinas é possivelmente no processo de reversão da disfunção endotelial, que parece decorrer em parte da sua capacidade em aumentar a produção de NO, a partir do estímulo da atividade, aumento da expressão e/ou bloqueio da inativação da eNOS (DAVIGNON, LEITER, 2005). Além disso, a inibição das proteínas Rho, principalmente a Rho A é um importante fator para a estabilização do mRNA da eNOS acarretando em um aumento do conteúdo protéico da mesma, com consequente aumento da vasodilatação (RIKITAKE et al., 2005).

Adicionalmente, os inibidores da HMG-CoA redutase também tem se demonstrado capazes de restaurar a atividade da eNOS na presença de hipóxia (LAUFS et al., 1998) e oxidação de LDL, condições estas que podem levar a disfunção endotelial (LAUFS et al., 1997), assim como bloquear a atividade da endotelina-1 e angiotensina-II, potentes vasoconstritores e a

caveolina-1, proteína que se liga a eNOS, regulando negativamente sua atividade (HERNANDEZ-PERERA et al., 1998).

Aliado aos efeitos sobre a atividade enzimática da eNOS, as estatinas podem inibir diversas citocinas pró-inflamatórias, assim como moléculas de adesão e a PCR (GONZALVEZ et al., 2004), contribuindo também com suas propriedades antiinflamatórias para reversão da disfunção endotelial a partir de sua ação sobre a COX-2 (ATAR et al., 2006). Atualmente existem fortes evidências de que o tratamento com estatinas pode atenuar os efeitos da inflamação no risco de eventos cardiovasculares. Nesse contexto, vários estudos têm demonstrado que as estatinas exercem ação antiinflamatória independente de sua ação hipolipemiante (McGOWN, BROOKES, 2007). Nessa linha, foi estudado o efeito tópico da sinvastatina em um modelo de inflamação de pele de camundongo. A aplicação tópica resultou em uma inibição da resposta inflamatória, podendo ser explicada pela resposta negativa da expressão de moléculas de adesão ou pela inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias que ocorre durante um evento inflamatório (OTUKI, PIETROVSKI, CABRINI, 2006).

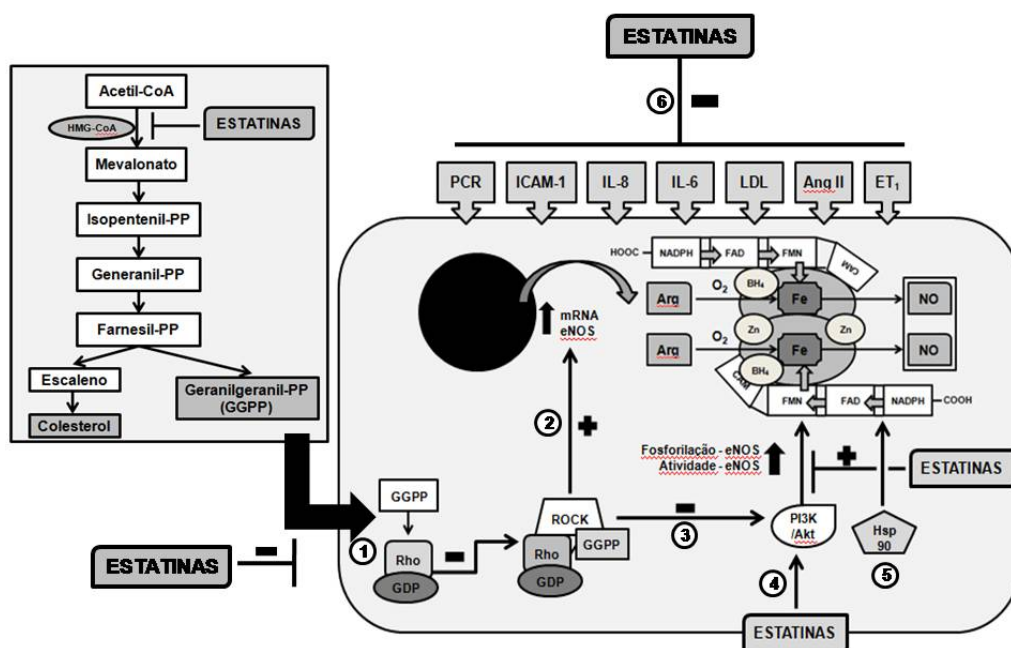
Estudos pré-clínicos indicam que a atorvastatina é capaz de reduzir o dano gerado por isquemia miocárdica através de aumento da produção de NO que por sua vez nitrosila a enzima COX-2, modulando sua atividade e aumentando a produção de PGI₂ (YE et al., 2006), uma prostaglandina que sabidamente reduz o tamanho do infarto (YE et al., 2000). Adicionalmente, um estudo recente demonstrou que a atorvastatina é capaz de promover um aumento na produção de 15-Epi-Lipoxina-A4, um mediador lipídico anti-

inflamatório, em células miocárdicas, através do aumento da expressão de enzimas envolvidas na síntese deste mediador (BIRNBAUM et al., 2006).

Estudos recentes indicam ainda que as estatinas, incluindo a sinvastatina, podem retardar a progressão de aterosclerose pela inibição da síntese de metaloprotease e inibição da ativação de fatores inflamatórios, tais como IL-1 β e TNF- α (KIM et al., 2011; SAXLIN et al., 2009). Dados experimentais demonstram que as estatinas são capazes de suprimir o estresse oxidativo, mediado principalmente pela fosfolipase D e NADPH oxidase (YASUNARI, MAEDA, MINAMI, 2001).

Além disso, o tratamento com estatinas tem demonstrado inibir a agregação plaquetária e formação de trombos em tecidos vasculares expostos a estresse oxidativo. Mecanismos postulados para estes efeitos antitrombóticos incluem aumento de NO e formação de GMPc, que podem contribuir ainda mais para as propriedades vasoprotetoras das estatinas (SAMSON, MINOGUCHI, TANAKA, 2006). Evidências crescentes obtidas a partir de estudos *in vitro* indicam que as estatinas afetam positivamente o sistema fibrinolítico, a partir da diminuição das concentrações plasmáticas de PAI-1 em culturas celulares endoteliais e de músculo liso (CHEN, XU, WANG, 2004). Assim, as estatinas podem interferir na progressão do processo aterosclerótico, trombótico, inflamatório independentemente da habilidade em reduzir o nível plasmático de colesterol (Figura 2).

FIGURA 2. Mecanismos moleculares das estatinas independentes da inibição da HMG-CoA redutase.



(1) Inibição da síntese de GGPP e consequente redução da ativação do sistema GDP. (2) Aumento da expressão do eNOS decorrente da inibição do sistema ROCK. (3) Bloqueio da ação negativa do sistema ROCK sobre a ativação da eNOS a partir de Akt. Aumento da fosforilação e ativação da eNOS decorrente da ativação do sistema PI3K/Akt. (5) Ativação da Hsp 90 acarretando no aumento da fosforilação e ativação da eNOS. (6) Inibição de estímulos pró-inflamatórios e pró-ateroscleróticos decorrentes de PCR, ICAM-1, IL-8, IL-6, LDL, Ang II e ET₁. Fonte: O Autor.

Na periodontite, as estatinas podem estar relacionadas não só pelo seu papel em uma possível disfunção endotelial como também podem estar atuando de forma direta na diminuição da perda óssea alveolar (KIM et al., 2011; NASSAR et al., 2009; SAVER et al., 2007). Em um modelo experimental de periodontite foi avaliada que a aplicação tópica da sinvastatina foi capaz de estimular a ativação da proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2) e de NO promovendo uma formação óssea alveolar em ratos (BRADLEY et al., 2007; RUAN, ZHENG, WANG, 2012). Mundy et al. identificaram que as estatinas são um potente ativador da BMP-2, que é um estimulador importante da diferenciação osteoblástica in vitro (MUNDY et al., 1999). Estudos têm

mostrado que a sinvastatina e a atorvastatina estimulam a transcrição de BMP-2 (GOSH-CHOUDHURY et al., 2007; CHEN et al., 2010).

Dados recentes sugerem que as estatinas podem influenciar a atividade metabólica óssea por suas ações em três moléculas: RANKL; RANK, e osteoprotegerina (OPG), conhecido como o receptor solúvel para RANKL (HORMDEE et al., 2005; AHN et al., 2008; AYUKAWA et al., 2009). O RANKL interage com o seu receptor correspondente, RANK, que assim induz a sua ativação para reabsorção óssea (LACEY et al., 1998). Stein et al determinaram os efeitos das estatinas na produção de OPG e RANKL. Ambas estatinas em estudo, atorvastatina e a sinvastatina, aumentaram a expressão de RANKL/OPG. Assim, estas estatinas podem influenciar a produção de RANKL e OPG e favorecer catabolismo ósseo, em condições não-inflamatórias (STEIN et al., 2011).

2. PROPOSIÇÃO

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito da administração sistêmica da sinvastatina sobre a perda óssea alveolar e alterações cardiovasculares induzidas por periodontite experimental em ratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da administração da sinvastatina sobre a perda óssea alveolar induzida pelo modelo de ligadura
- Avaliar o efeito da sinvastatina sobre a função endotelial de animais com periodontite induzida por ligadura, através de dois agentes vasodilatadores (acetilcolina e nitroprussiato de sódio);
- Analisar o impacto da periodontite e do uso da sinvastatina sobre o perfil lipídico e de marcadores inflamatórios sistêmicos dos animais;
- Compreender a relação entre a periodontite/eventos cardiovasculares/sinvastatina, possibilitando uma abordagem terapêutica racional nas alterações produzidas pela periodontite e as complicações cardiovasculares subsequentes;
- Avaliar as diferenças entre os valores de pressão arterial média, sistólica, diastólica e frequência cardíaca frente ao tratamento com sinvastatina em animais com doença periodontal e sem doença periodontal;

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1. ANIMAIS:

Foram utilizados ratos 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 02590/2012) e os animais foram manipulados conforme recomendações da SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório).

3.2. COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS

As seguintes substâncias foram utilizadas neste estudo: nitroprussiato de sódio e acetilcolina (Merck, Brasil); heparina sódica (Cristália Produtos Farmacêuticos, São Paulo, SP); quetamina (Parke-Davis, São Paulo, SP, Brasil); xilazina (Bayer; São Paulo, SP, Brasil); sinvastatina (Zhejiang M, China); azul de metileno e peróxido de hidrogênio (Rivax, Ponta Grossa, Brasil). Os reagentes utilizados para preparo de soluções foram dissolvidos em água Milli-Q.

3.3. INDUÇÃO DA PERIODONTITE ATRAVÉS DE LIGADURAS:

Para o procedimento de colocação das ligaduras, os ratos foram anestesiados com uma combinação de quetamina (75 mg/Kg) e de xilazina (15 mg/Kg), injetados via intraperitoneal. Os animais foram posicionados em um

aparato de Doku, a fim de que permanecessem com a boca aberta para a colocação das ligaduras. Para as ligaduras, usou-se fio de algodão (Tex 34 Glacê 50 – Lipasa – Brasil). Os dentes dos animais foram levemente luxados com o auxílio de uma sonda exploradora (Figura 3, painel A), para criar um espaço para a colocação das ligaduras. As ligaduras foram colocadas nos primeiros molares inferiores (Figura 3, painel B) e segundos molares superiores, bilateralmente, atentando-se para que as ligaduras ficassem posicionadas dentro do sulco gengival, com o nó na face mesial dos molares inferiores e na face palatina dos molares superiores (Llavaneras et al. 2001, Achong et al. 2003, Galvão et al. 2003, Buduneli et al. 2004). As ligaduras foram colocadas bilateralmente a fim de se evitar qualquer possível distúrbio no padrão mastigatório do animal (Dumitrescu et al. 2004). Os animais do grupo falso-operado foram submetidos aos mesmos procedimentos, porém o nó não foi realizado e a ligadura foi imediatamente removida.

Figura 3. Colocação das ligaduras nos ratos.



A: dente sendo luxado com o auxílio de sonda exploradora a fim de se criar espaço para colocação da ligadura. B: colocação da ligadura finalizada. Fonte: O Autor.

3.4. AVALIAÇÃO DA LIGADURA NO PESO E NA ALIMENTAÇÃO DOS RATOS

A fim de se avaliar a influência da técnica de ligaduras sobre o padrão alimentar dos animais, foi realizado um experimento para verificar se as ligaduras colocadas poderiam influenciar na alimentação diária dos ratos e, conseqüentemente no seu peso. Os animais foram divididos em três grupos: grupo ligadura, grupo falso-operado e grupo naive. A avaliação do peso e da quantidade de ração consumida ocorreu nos dias 1, 3, 7, 14, 21 e 28. Um dia antes eram pesados 150 gramas de ração para cada caixa com quatro ratos. Vinte e quatro horas depois eram pesadas a quantidade de ração que sobrava e calculava-se o consumo através da diferença. Uma média era realizada para determinar a quantidade de ração consumida por rato. Em seguida, os ratos eram pesados.

3.5. TESTE DE CAMPO ABERTO

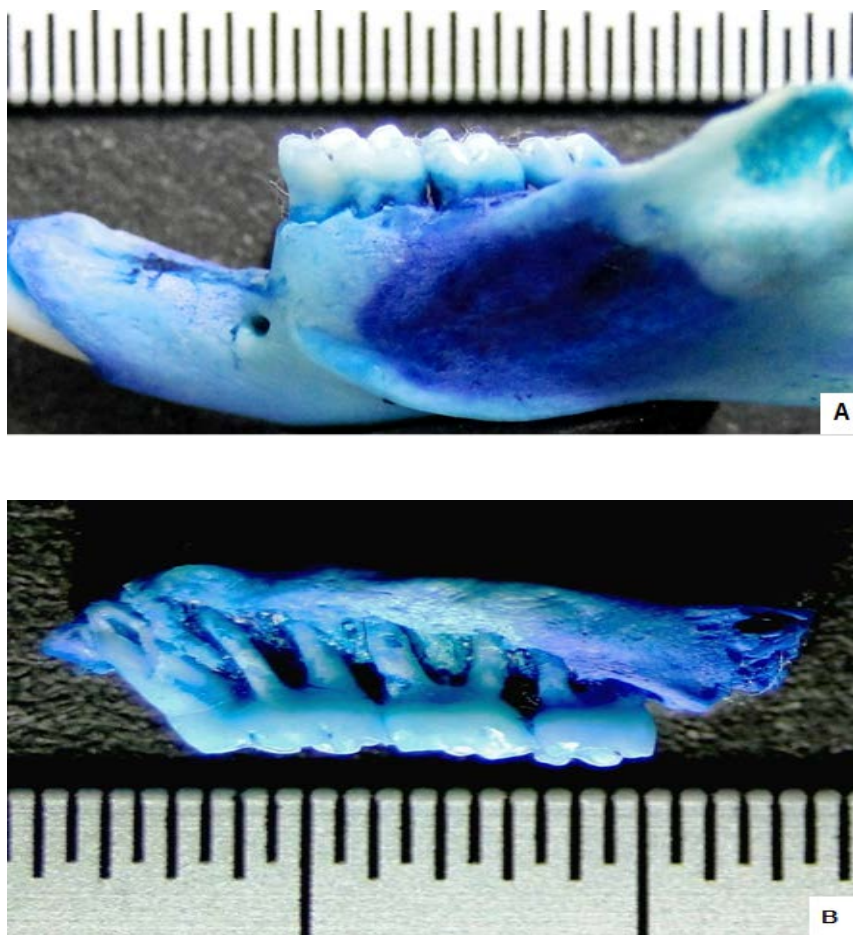
A fim de se determinar um possível efeito deletério da sinvastatina sobre a musculatura esquelética do animal foi avaliado se a dose utilizada de 10mg/kg/dia poderia influenciar na locomoção do animal. Para isso realizou-se o teste de campo aberto. No procedimento coloca-se o animal em uma caixa de madeira (1 metro X 1 metro) quadriculada por um período de cinco minutos. Durante esse período quantifica-se a atividade de locomoção do rato a partir da contagem do número de setores adentrados pelo animal nesse intervalo de tempo estipulado. Adicionalmente foi analisado o comportamento de levantar-se nas patas posteriores (*rearing*) a partir de registro em um cronômetro manual simples. Para este protocolo os animais foram divididos em três grupos: grupo sinvastatina, grupo veículo (água destilada) e grupo naive. Para

avaliar o efeito da sinvastatina o procedimento ocorreu em um período de 7 dias (a avaliação ocorreu nos dias 1, 4 e 7).

3.6. MENSURAÇÃO DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR - Exame morfométrico

Após a morte dos animais através de sobredose anestésica – quetamina e xilazina – a mandíbula e maxila foram retiradas para análise da perda óssea induzida pela ligadura e, portanto caracterização da periodontite. Após a retirada do tecido gengival da região das hemi-mandíbulas e maxilas, a parte óssea subjacente foi submetida a procedimento de fervura em água por 30 minutos, com posterior imersão das amostras em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10v ou 3% por 12 horas. Depois das amostras estarem bem secas, estas foram imersas e imediatamente removidas de solução de azul de metileno (1 g/100 mL), para delinear a linha da junção cimento-esmalte. O método utilizado para quantificar a perda óssea periodontal foi adaptado de Björnsson et al. (2003). As amostras foram fotografadas em uma Lupa Digital da marca Zeiss Stemi 2000-C, Carl Zeiss do Brasil Ltda, Brasil, salvas em um computador e as medidas – das regiões linguais e vestibulares das mandíbulas e das maxilas – foram entre a junção cimento-esmalte e a crista de óssea alveolar. As imagens foram analisadas pelo programa Image-Pro Plus® Version 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Foram consideradas cinco medidas lineares para cada face dos dentes inferiores e três medidas lineares para cada face dos dentes superiores.

Figura 4. Fotos da mandíbula e da maxila de ratos preparados para mensuração da perda óssea.



Fotos da mandíbula (A) e maxila (B) para posteriores demarcações lineares a fim de se mensurar a perda óssea alveolar média (em mm) dos animais. Fonte: O Autor.

3.7. QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES, PERFIL LIPÍDICO E HEMATOLÓGICO

3.7.1. AVALIAÇÃO DE MARCADOR DE LESÃO MUSCULAR

Os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina. As amostras de sangue total foram obtidas por punção cardíaca e colocadas em frascos frescos contendo heparina. Através de um kit específico foi mensurada a creatina quinase (CK). O kit consiste em um sistema cinético específico para a determinação da creatina quinase no plasma – CK-NAC – (Doles, Goiânia,

Brasil) para determinar possíveis reações adversas da dose utilizada de sinvastatina.

3.7.2. AVALIAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO E HEMATOLÓGICO

O hemograma completo foi determinado pelo Cell Dyn 1400 (Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois, EUA). A análise do perfil lipídico no plasma foram determinadas pelo Selectra Junior (Vital Scientific, Van Rensselaerweg, Holanda).

3.7.3. AVALIAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS

Os marcadores inflamatórios dosados foram a Interleucina-6 (IL-6) e a Proteína C-Reativa (hsPCR). A IL-6 foi quantificada utilizando um kit ELISA (RayBiotech, Inc, Atlanta, EUA). Para a hsPCR a medição foi realizada através do método ELISA altamente sensível (Immunology Consultants Laboratory, Newberg, EUA).

3.8. MENSURAÇÃO DE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

Avaliação em animais anestesiados por método invasivo

Os animais foram anestesiados e sedados com uma combinação de quetamina (75 mg/Kg) e de xilazina (15 mg/Kg), injetados via intramuscular. Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida (temperatura entre 35 e 36° C). A veia femoral foi localizada e então foi feita a inserção de uma agulha acoplada a uma cânula de polietileno (PE 50) e seringa. Esse acesso venoso serviu para administração dos compostos que foram utilizados nos estudos. Na sequência, a artéria carótida esquerda foi localizada e, de forma cuidadosa e rápida, separada do nervo vago e tecidos adjacentes. Foi realizada então, a inserção

de um catéter de polietileno (Angiocath®, número 19), devidamente heparinizado, o qual foi firmemente amarrado na artéria e conectado a um transdutor de pressão acoplado ao PowerLab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Os valores de pressão arterial média, sistólica e diastólica (em mmHg) e da frequência cardíaca (em batimentos por minuto, bpm) foram registrados em um computador por um software de integração (ChartPro7®). Após um período de 30 minutos de estabilização, a reatividade vascular para acetilcolina e nitroprussiato de sódio foi avaliada através da injeção (subseqüente) de três doses crescentes de cada um destes compostos (3, 10 e 30 nmol/kg para ambas). Ao final do experimento os animais foram sacrificados por sobredosagem anestésica – quetamina e xilazina.

Avaliação em animais conscientes por método não invasivo – Tail-cuff

Com o intuito de avaliar os efeitos da periodontite e da sinvastatina de forma temporal na pressão arterial dos animais em experimento, foi realizado o experimento de *Tail Cuff*. Para uma determinação fiel da pressão arterial do animal, é necessário que se tome certos cuidados para diminuir o stress no animal. Dentre estes cuidados pode-se citar o treinamento prévio do animal em relação à imobilização no contensor; a determinação deverá ocorrer em uma sala isolada, longe de movimentação e de sons que causem perturbação no comportamento animal; a sala deve estar climatizada em torno de 29°C.

Durante os sete dias que antecedem o experimento, os animais sofrerão um condicionamento ao contensor utilizado no procedimento. Durante esses dias, no mesmo horário no qual o experimento será realizado, os animais permanecerão imóveis por 5 minutos no interior do contensor, simulando o que ocorrerá na data do experimento. Desta maneira ao final do sétimo dia, o

animal aprende que o contensor não lhe oferece um perigo maior. Como já mencionado, esta prática diminuiu o stress causado no animal devido à imobilização, permitindo assim uma melhor coleta dos valores da pressão arterial.

No dia do experimento, os animais foram colocados no contensor, em seguida o manguito do *Tail cuff* e o grampo de determinação da frequência cardíaca serão posicionados na cauda do animal. Estas peças são acopladas ao PowerLab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Após um período de 30 minutos de estabilização, os valores da frequência cardíaca e da pressão arterial sistólica serão registrados em um computador por um software de integração (ChartPro7®). A avaliação temporal ocorreu nos dias 1, 7 e 14 do experimento.

3.9. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Protocolo experimental 1: Avaliação do efeito de 4 ligaduras sobre o padrão alimentar e peso dos ratos.

No dia 1, os ratos foram divididos em 2 grupos. Metade foi submetido ao procedimento de colocação de ligaduras para indução da periodontite, e a outra metade foi submetida à falsa-cirurgia (as ligaduras foram colocadas e imediatamente removidas). Nos dias 1, 3, 7, 14, 21, e 28 avaliou-se a influência da técnica de ligadura na alimentação e peso dos ratos. Após os animais foram sacrificados através de sobredose anestésica com quetamina e xilazina.

Protocolo experimental 2: Avaliação do efeito da sinvastatina sobre a atividade motora e esquelética dos animais.

No dia 1, os ratos foram divididos em 2 grupos: tratado (sinvastatina), veículo (água destilada). Para avaliar a influência da sinvastatina na atividade motora dos ratos foi realizado o teste de campo aberto nos dias 1, 4 e 7.

Para avaliar o efeito da sinvastatina no músculo esquelético foi realizada também a quantificação de CK-NAC, entretanto para isso foi utilizadas as mesmas amostras de sangue coletadas de acordo com o protocolo 3 (abaixo).

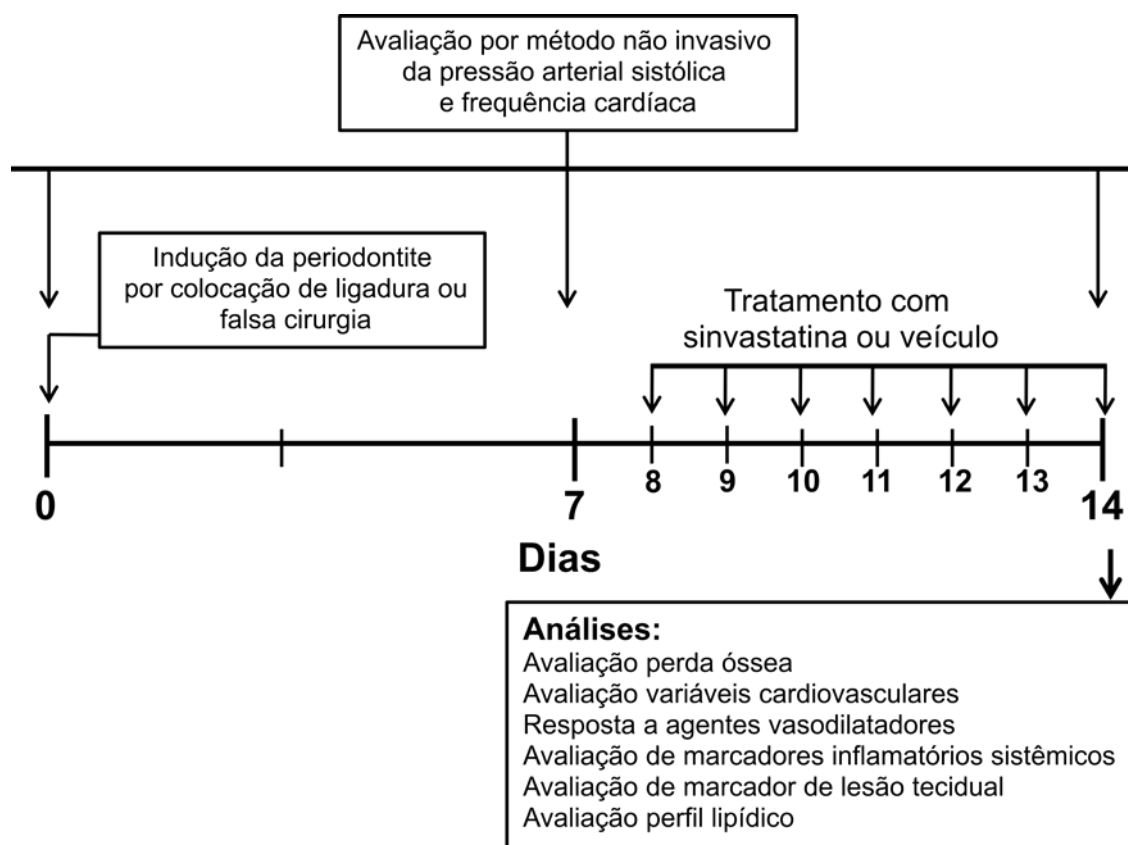
Protocolo experimental 3: Efeito da sinvastatina sobre a perda óssea e alterações cardiovasculares induzidas pela periodontite.

No dia 1, os animais eram preparados para análise de pressão arterial pelo *Taill Cuff*. Posteriormente, os ratos utilizados para o experimento foram randomizados. Metade dos animais recebeu ligaduras para indução da periodontite, e a outra metade foi submetida à falsa-cirurgia (as ligaduras foram colocadas e imediatamente removidas). No dia 7 os animais eram novamente preparados para análise de pressão arterial pelo *Taill Cuff*. No dia 8, os animais foram randomizados nos seguintes grupos:

- Falso-operado + veículo: os ratos foram submetidos a falsa-cirurgia e tratados com água destilada (0,5mL/dia);
- Falso-operado + sinvastatina: os ratos foram submetidos a falsa-cirurgia e tratados com sinvastatina 10mg/kg/dia;
- Ligadura + veículo: os ratos receberam as ligaduras e tratados com água destilada (0,5mL/dia);
- Ligadura + sinvastatina: os ratos receberam as ligaduras e foram tratados com sinvastatina 10mg/kg/dia.

No décimo quarto dia, os animais foram inicialmente preparados para análise de pressão arterial pelo *Tail Cuff*. Após os animais eram anestesiados – quetamina e xilazina – para análise dos parâmetros cardiovasculares (resposta a agentes vasoativos, pressão arterial média e frequência cardíaca). Foi realizada coleta de sangue para posterior quantificação de parâmetros bioquímicos, hematológicos, marcadores inflamatórios e CK-NAC e então os animais foram sacrificados. Após sacrifício através de sobredose anestésica – quetamina e xilazina – os ratos tiveram suas mandíbulas e maxilas removidas para mensuração da perda óssea alveolar (figura 5).

Figura 5. Representação cronológica do experimento 3.



4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

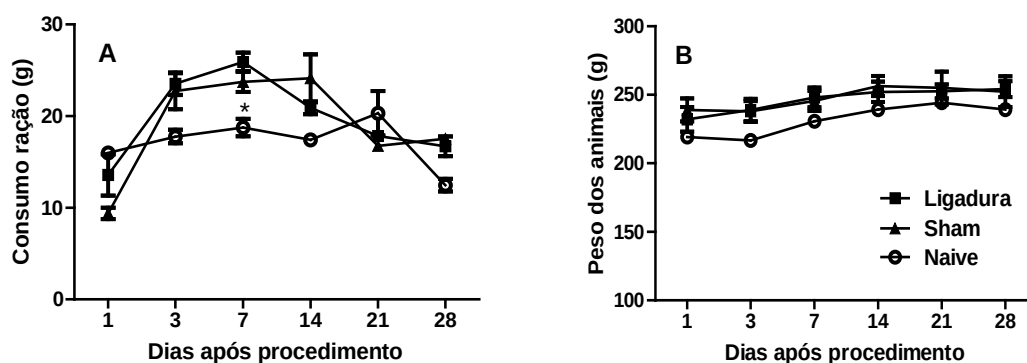
Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M). A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de duas vias (ANOVA de duas vias) seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. O nível de significância aceito para os testes foi de $P < 0,05$.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

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA LIGADURA NA ALIMENTAÇÃO E PESO DOS RATOS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE

Foi determinado o efeito da ligadura no consumo de ração e consequentemente no peso dos ratos. Como reportado na figura 6, painel A, no sétimo dia de avaliação foi observado um maior consumo de ração nos grupos submetidos ao procedimento cirúrgico (falso-operado e ligadura) comparado estatisticamente com o grupo que não foi submetido a nenhum procedimento cirúrgico (naive). Em relação ao peso dos animais, foi observado um aumento sutil ao longo dos 28 dias de experimento, entretanto, não houve diferença entre os grupos (Figura 6, painel B).

Figura 6. Efeito da periodontite induzida pela colocação de ligadura sobre a alimentação e peso dos animais.

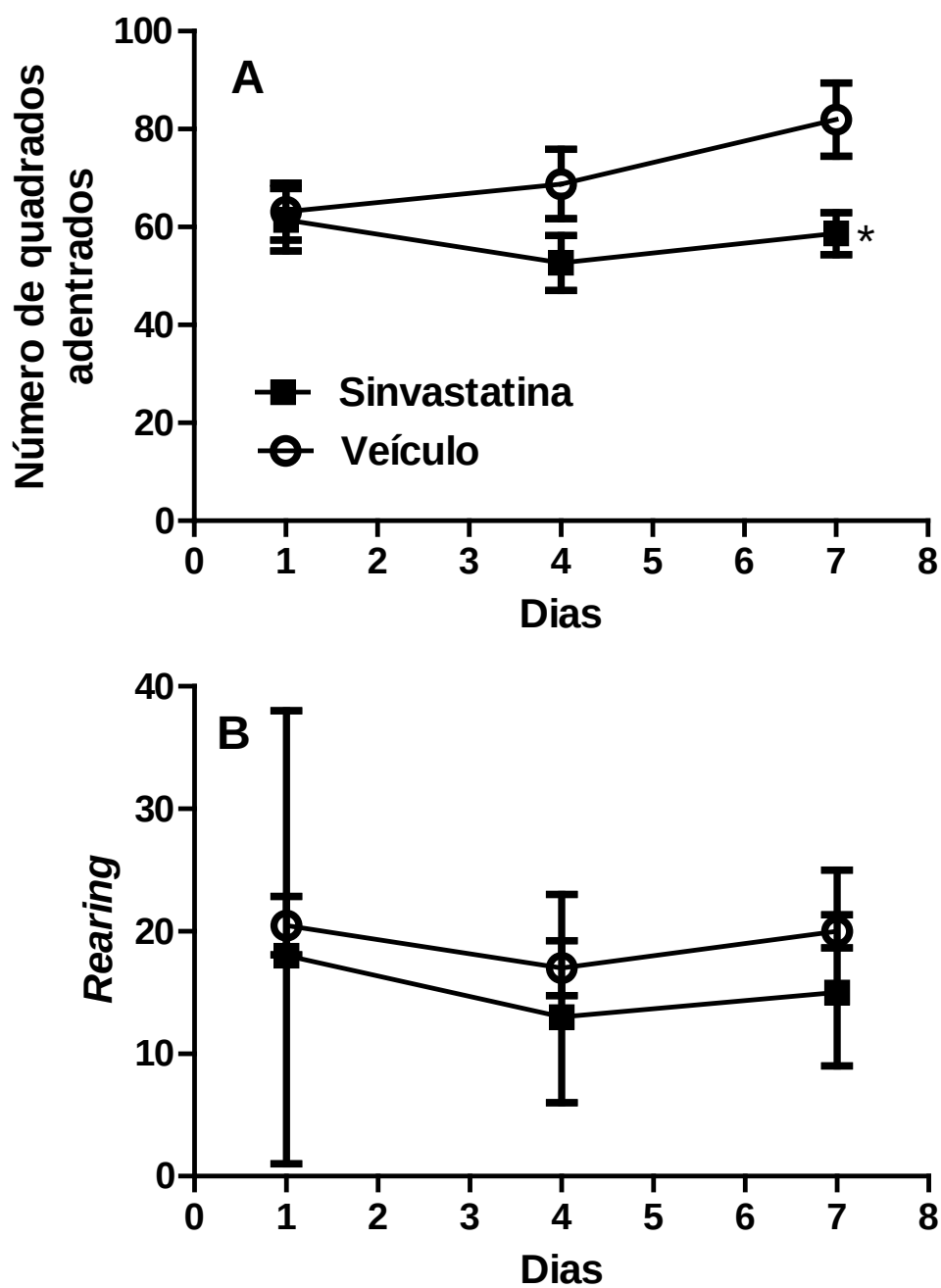


Os animais foram submetidos ao procedimento de colocação da ligadura ou falsa cirurgia e o consumo de ração (A) e peso dos animais (B) foram avaliados por um período de 28 dias. O grupo naive não foi submetido a nenhum procedimento. As barras representam a média e a linha acima da barra o erro padrão da média de 8 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. (* $p < 0.05$, em relação ao grupo naive).

5.2. TESTE DE CAMPO ABERTO E QUANTIFICAÇÃO DA CREATINA QUINASE – CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA SINVASTATINA SOBRE LESÃO DO MÚSULO ESQUELÉTICO

A fim de se caracterizar possíveis efeitos da sinvastatina sobre a atividade motora dos animais, realizou-se um teste de campo aberto. Para isso, os ratos foram tratados por 7 dias com sinvastatina (10mg/kg/dia, v.o.) e diariamente foram realizados o teste de campo aberto e *rearing* (capacidade do rato em levantar-se apenas com as patas traseiras). Nota-se na figura 7 – painel A, que o tratamento com sinvastatina reduziu apenas no último dia a atividade locomotora do animal quando comparado com o veículo. Por outro lado, na avaliação do *rearing* não houve diferença estatística entre os grupos.

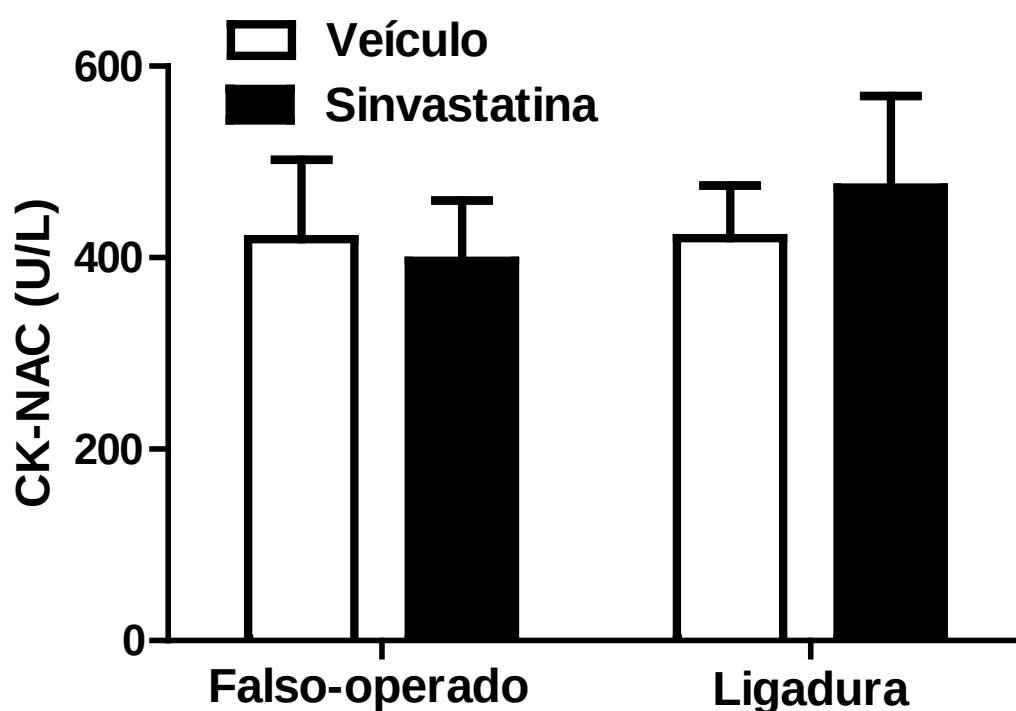
Figura 7. Efeito da sinvastatina sobre o comportamento físico do animal no teste de campo aberto.



Os animais foram tratados com sinvastatina (10 mg/kg/dia v.o.) ou veículo (100 μ L/100 g, v.o.) por 7 dias. As barras representam a média e a linha 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.

Com o intuito de analisar possível dano na musculatura esquelética causada pela dose de sinvastatina utilizada, realizou-se a dosagem da creatina quinase. O teste caracteriza uma possível lesão muscular do animal. E como pode ser observado, o tratamento promovido não gerou lesão muscular (Figura 8). Não há diferença entre o grupo que recebeu sinvastatina com o grupo que recebeu veículo.

Figura 8. Avaliação de um marcador sérico de lesão muscular.

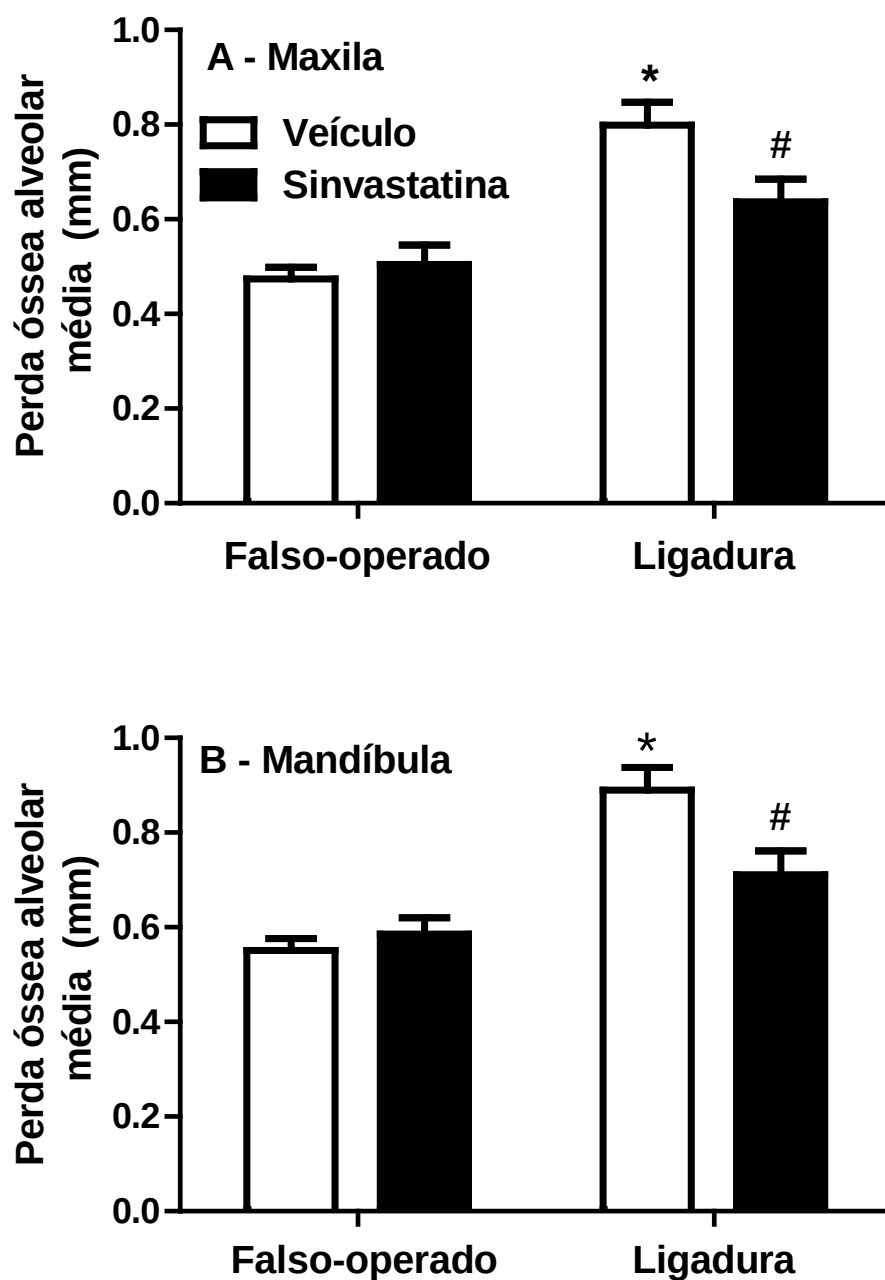


A partir do oitavo dia após o procedimento de colocação das ligaduras ou falsa cirurgia, os animais foram tratados diariamente com sinvastatina (10 mg/kg, v.o.) ou veículo (água, 100 μ L/100 g, v.o.). No décimo quarto dia foi realizada a coleta de sangue para análise da creatina quinase. As barras representam a média e a linha 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.

5.3. PERDA ÓSSEA ALVEOLAR MÉDIA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE – CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA SINVASTATINA

A fim de se avaliar o efeito da sinvastatina sobre a perda óssea alveolar decorrente da periodontite, no décimo quarto dia, realizou-se o experimento descrito na figura 5. Foram colocadas quatro ligaduras ao redor dos segundos molares superiores e primeiros molares inferiores de ambos os lados (direito e esquerdo). Os resultados foram então agrupados para avaliação da perda óssea alveolar. Como pode ser observado, houve uma perda óssea significativa no grupo ligadura veículo com seu respectivo falso-operado. Mas também nota-se que o tratamento com a sinvastatina, mesmo quando iniciado 7 dias após a colocação das ligaduras, diminuiu a perda óssea alveolar do grupo ligadura sinvastatina comparado com o grupo ligadura veículo.

Figura 9. Efeito da sinvastatina sobre a perda óssea alveolar média (mm) na maxila e na mandíbula nos ratos submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.

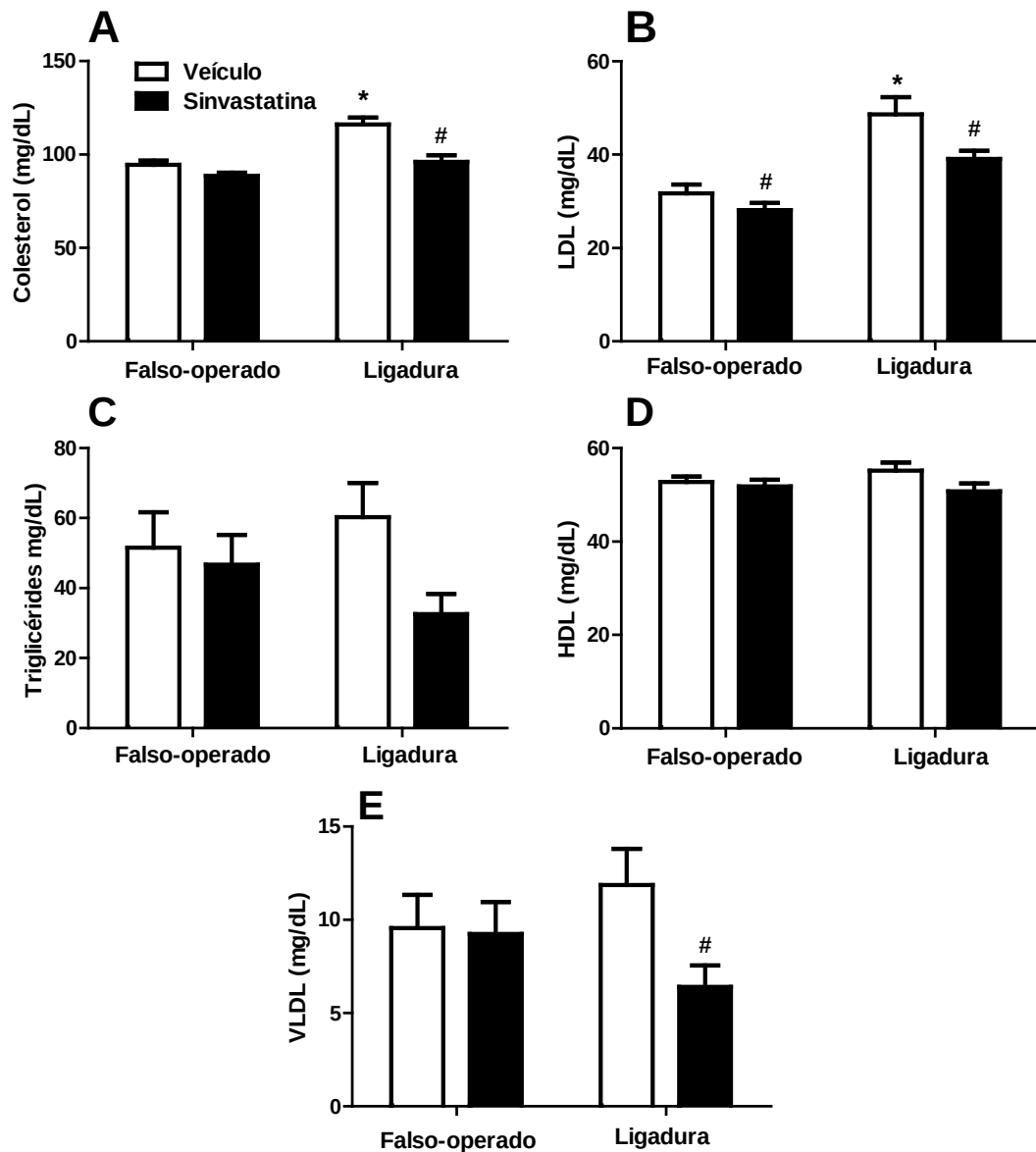


Os animais foram tratados com sinvastatina (10 mg/kg/dia, v.o.) ou veículo (água, 100 µL/100g, v.o.) a partir do oitavo dia ao décimo quarto dia do experimento. Após 7 dias de tratamento os animais foram sacrificados e tiveram suas mandíbulas e maxilas removidas para a mensuração da perda óssea alveolar. As barras representam a média e a linha 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 veículo; # $p < 0.05$, em relação ao grupo ligadura veículo).

5.4. PERFIL LIPÍDICO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE – AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SINVASTATINA

Foi avaliado o efeito da sinvastatina no perfil lipídico durante a periodontite. Como pode ser evidenciada na figura 10, a periodontite aumentou os níveis de colesterol, LDL comparado com o respectivo falso-operado. O tratamento com sinvastatina preveniu o aumento dos níveis de colesterol total (Figura 10, painel A) e LDL (Figura 10, painel B). Embora a periodontite induzida por ligadura não tenha alterado os níveis basais de VLDL, a sinvastatina reduziu o VLDL somente no grupo ligadura (Figura 10, painel E).

Figura 10. Perfil lipídico em um modelo experimental de periodontite.

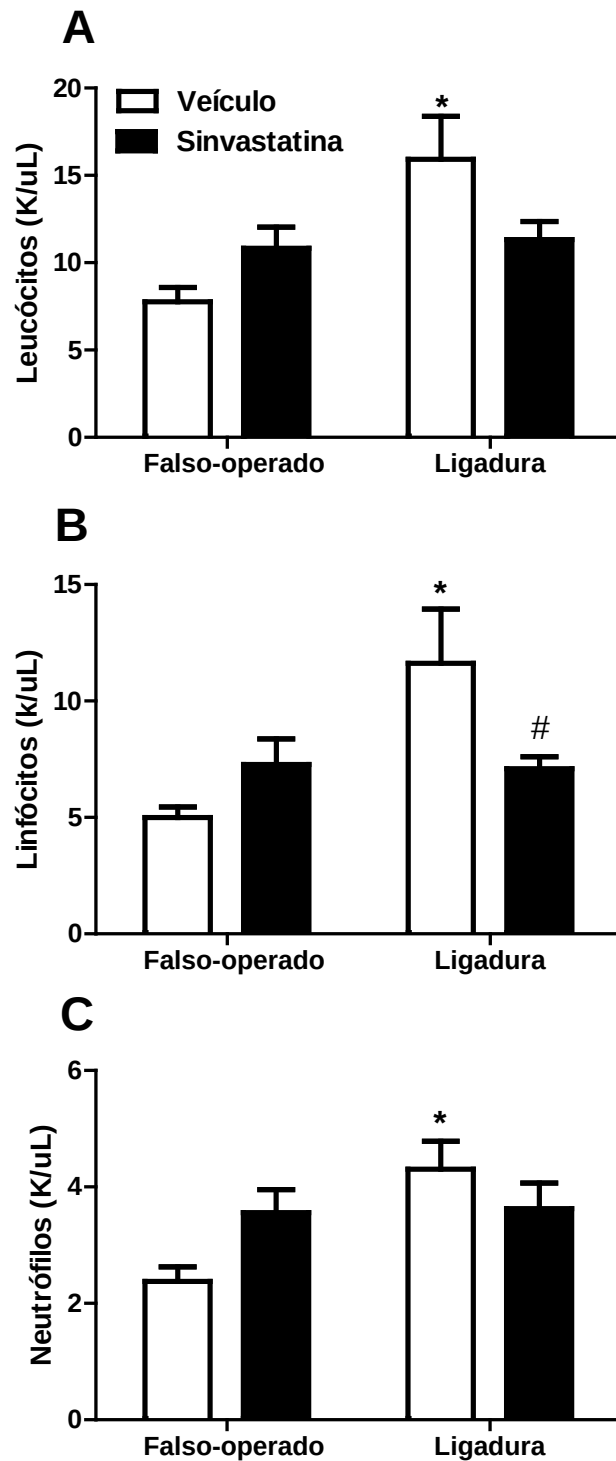


Os animais foram tratados diariamente com sinvastatina (10 mg/kg/dia, v.o.) ou veículo (água, 100 µL/100g, v.o.) a partir do oitavo dia após a colocação das ligaduras ou da falsa cirurgia. Após sete dias de tratamento os animais tiveram o sangue coletado para avaliação do perfil lipídico. As barras representam a média e a linha 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 veículo; # $p < 0.05$, em relação ao grupo ligadura veículo).

5.5. QUANTIFICAÇÃO DE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS SISTÊMICOS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE – AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SINVASTATINA

No último dia de tratamento, foi realizada coleta de sangue por punção cardíaca para análise dos componentes sanguíneos e dos marcadores IL-6 e PCR. A periodontite induzida pela ligadura aumentou a série branca (leucocitose, linfocitose e neutrofilia) no grupo ligadura veículo comparada estatisticamente com o seu respectivo falso-operado. Em contrapartida, evidenciamos uma diminuição no número de linfócitos e leucócitos no grupo ligadura submetido ao tratamento com sinvastatina comparado com o ligadura veículo. Não foram encontradas alterações nos demais parâmetros hematológicos avaliados (Tabela 3).

Figura 11. Análise de componentes sanguíneos (série branca) em um modelo experimental de periodontite.



Os animais foram tratados com sinvastatina (10mg/kg/dia, v.o.) ou veículo (água, 100 µL/100 g, v.o.) a partir do oitavo dia ao décimo quarto dia do experimento. Após 7 dias de tratamento foi realizada coleta sanguínea por punção cardíaca. 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 veículo; # $p < 0.05$, em relação ao grupo ligadura veículo). Valores referenciais de 8 animais por grupo.

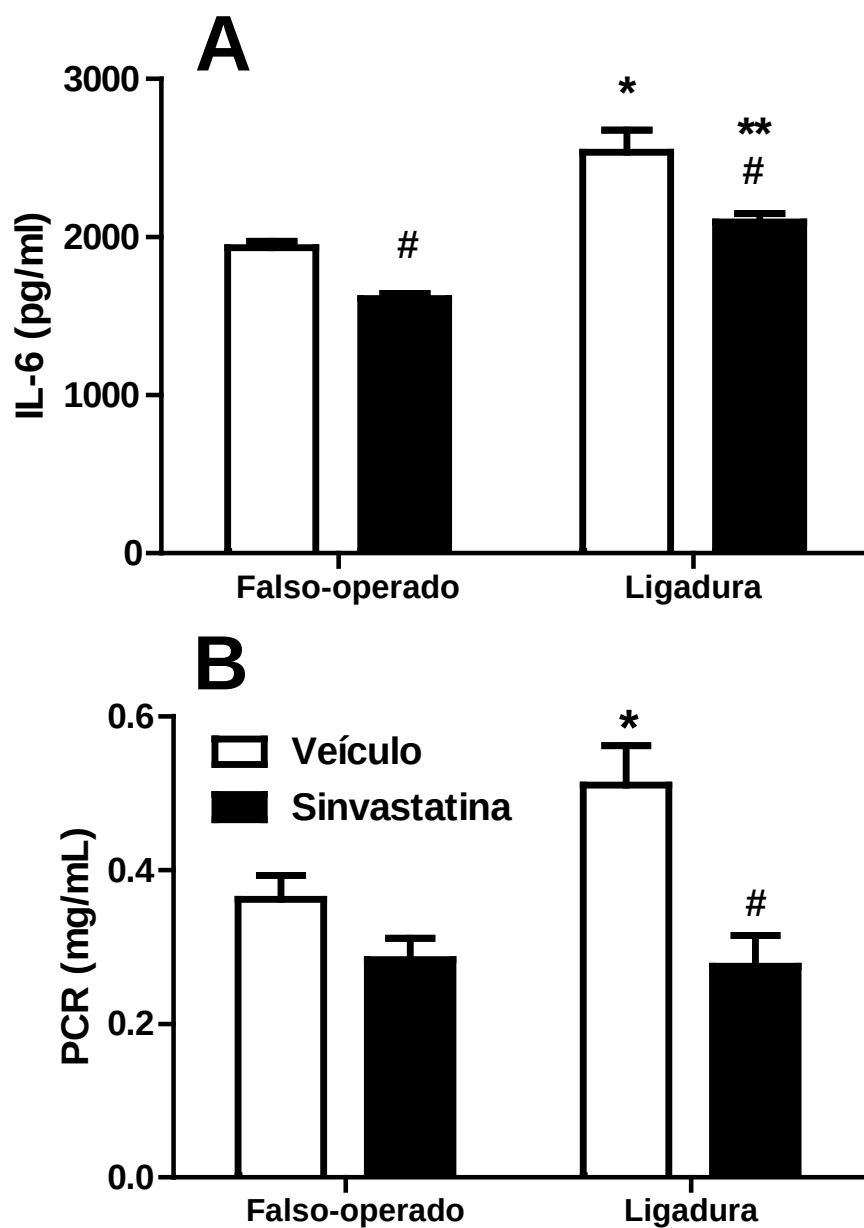
TABELA 2: Quantificação dos componentes sanguíneos dos respectivos grupos do experimento.

Componentes	Falso-operado	Falso-operado	Ligadura	Ligadura
Sanguíneos	Veículo	Sinvastatina	Veículo	Sinvastatina
Plaquetas (K/uL)	559±108.84	463±113.33	456±73.24	484±112.48
Hemácias (K/uL)	6.82±0.13	6.98±0.07	6.91±0.11	6.91±0.13
HCT (%)	40.28±0.77	41.8±0.38	40.83±0.64	40.06±0.73
VCM (fL)	59.05±0.31	59.87±0.22	59.08±0.48	57.96±0.38
HCM (pg)	20.05±0.14	19.78±0.13	19.95±0.22	19.51±0.20
CHCM (g/dL)	33.96±0.17	33.05±0.19	33.76±0.14	33.70±0.22
HGB (g/dL)	13.67±0.25	13.81±0.15	13.78±0.21	13.48±0.15
RDW (fL)	33.77±0.57	35.10±0.39	34.47±0.25	34.30±0.64

Hemograma em um modelo experimental de periodontite. Os animais foram tratados com sinvastatina (10 mg/kg/dia, v.o.) ou veículo (água, 100 µL/100g, v.o.) a partir do oitavo dia ao décimo quarto dia do experimento. Após 7 dias de tratamento foi realizada coleta sanguínea por punção cardíaca. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni. Valores referenciais de 8 animais por grupo.

Na sequencia avaliamos o efeito da sinvastatina sobre marcadores inflamatórios. A periodontite induzida por ligadura gerou um aumento tanto dos níveis circulantes de IL-6 quanto de PCR (Figura 12). O tratamento com a sinvastatina preveniu o aumento induzido pela periodontite de IL-6 (figura 12, painel A) e de PCR (figura 12, painel B). Interessantemente, a sinvastatina além de impedir o aumento da IL-6 induzido pela ligadura, diminuiu os valores de IL-6 no grupo falso-operado (Figura 12, painel A).

Figura 12. Efeito da sinvastatina em marcadores inflamatórios (IL-6 e PCR).

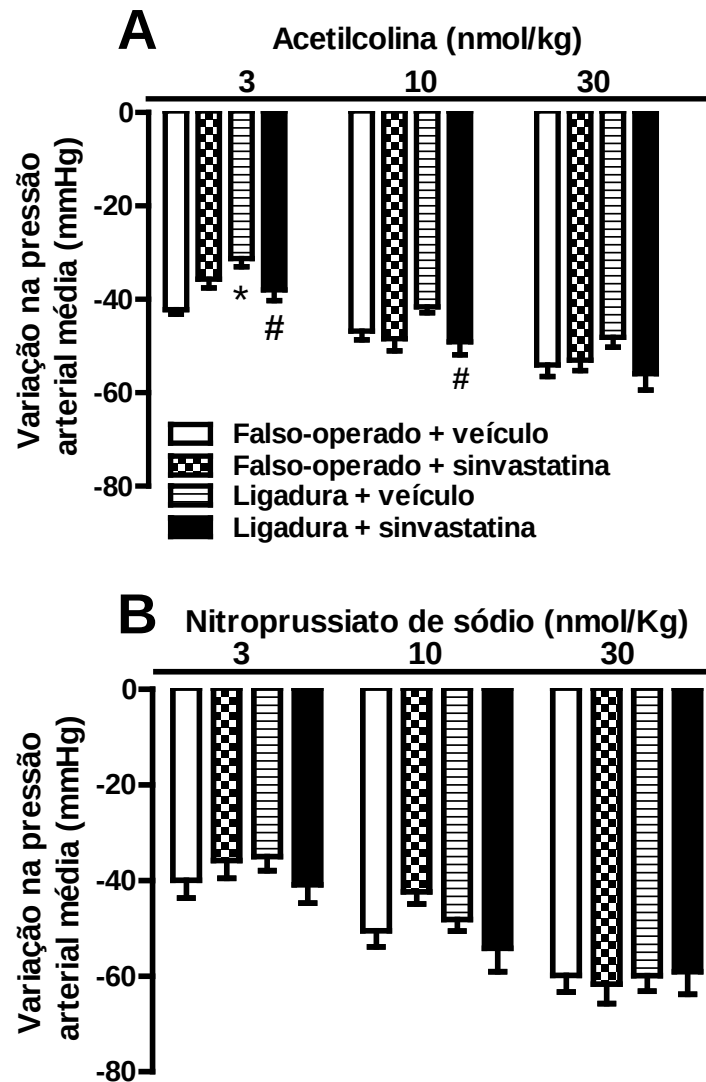


Os animais foram tratados com sinvastatina (10 mg/kg/dia) ou veículo (água, 100 µL/100 g, v.o.) a partir do oitavo dia após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia. Após sete dias de tratamento foi realizada coleta sanguínea para análise das citocinas IL-6 e hsPCR. As barras representam a média e a linha 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 veículo; ** $p < 0.05$, em relação aos grupos falso-operado sinvastatina; # $p < 0.05$, em relação ao grupo ligadura veículo).

5.6. PARÂMETROS CARDIOVASCULARES EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE – CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DA SINVASTATINA

Em seguida avaliamos o efeito da sinvastatina em animais com periodontite sobre a resposta vasodilatadora a dois diferentes agentes, acetilcolina e nitroprussiato de sódio. Estatisticamente, a resposta à acetilcolina ficou diminuída no grupo ligadura veículo na dose de 3 nmol/kg comparada com o seu respectivo falso-operado. Como pode ser observado na figura 13, painel A o grupo ligadura sinvastatina apresentou uma maior vasodilatação, nas doses de 3 e 10 nmol/kg, com relação ao grupo ligadura veículo. Na sequência, foi avaliada a resposta vasodilatadora dos animais ao nitroprussiato de sódio. Não foram observadas alterações dentre os grupos (figura 13, painel B).

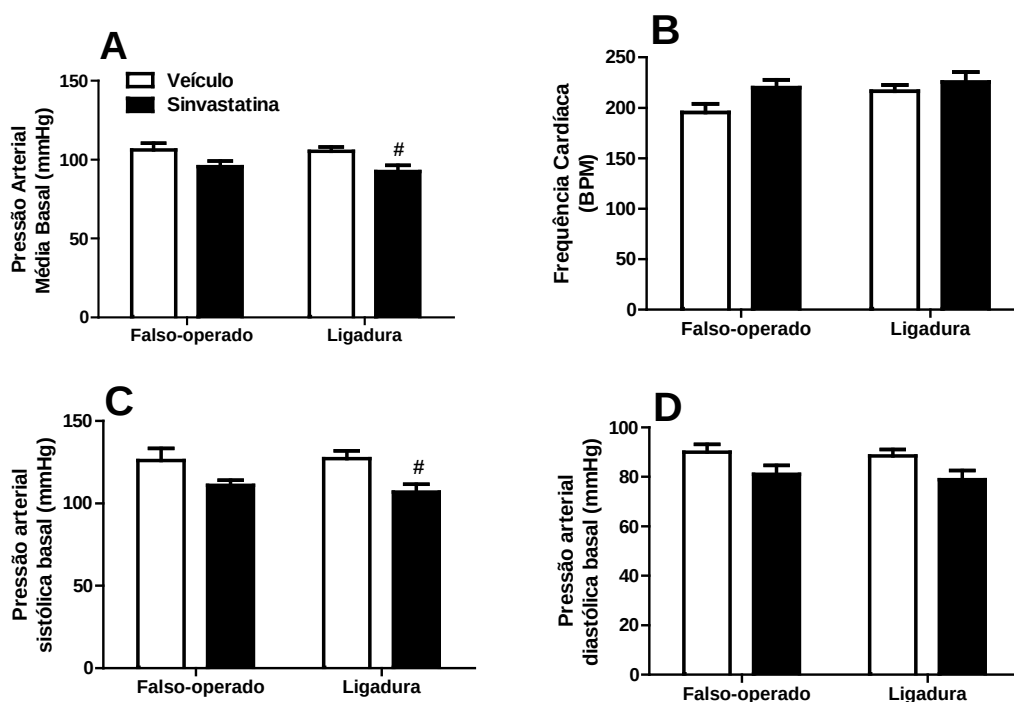
Figura 13. Efeito da sinvastatina sobre pressão arterial média (mmHg) induzida pela acetilcolina, nitroprussiato de sódio e pela angiotensina II em ratos submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa-cirurgia.



Os ratos foram tratados com sinvastatina (10 mg/kg/dia, v.o.) ou veículo (água, 100 µL/100g, v.o.) a partir do décimo quarto dia após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia. Após 7 dias de tratamento os animais foram preparados para registro da pressão arterial. Doses crescentes de acetilcolina e nitroprussiato de sódio foram injetadas (i.v.) e a variação na pressão arterial média foi registrada. As barras representam à média e as 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 veículo; # $p < 0.05$, em relação ao grupo ligadura veículo).

Foi avaliada também a pressão arterial média basal dos grupos experimentais. Como pode ser observado na figura 14, painel A, foi encontrada uma redução na pressão arterial média basal no grupo ligadura sinvastatina comparado com o ligadura veículo. A diferença desses valores pode também ser evidenciada na pressão arterial sistólica basal (figura 14, painel C). Por outro lado, a sinvastatina não alterou os valores de frequência cardíaca basal dos grupos estudados (Figura 14, painel B).

Figura 14. Efeito da sinvastatina sobre a pressão arterial média, frequência cardíaca (BPM), sistólica e diastólica basal (mmHg) em um modelo experimental de periodontite.

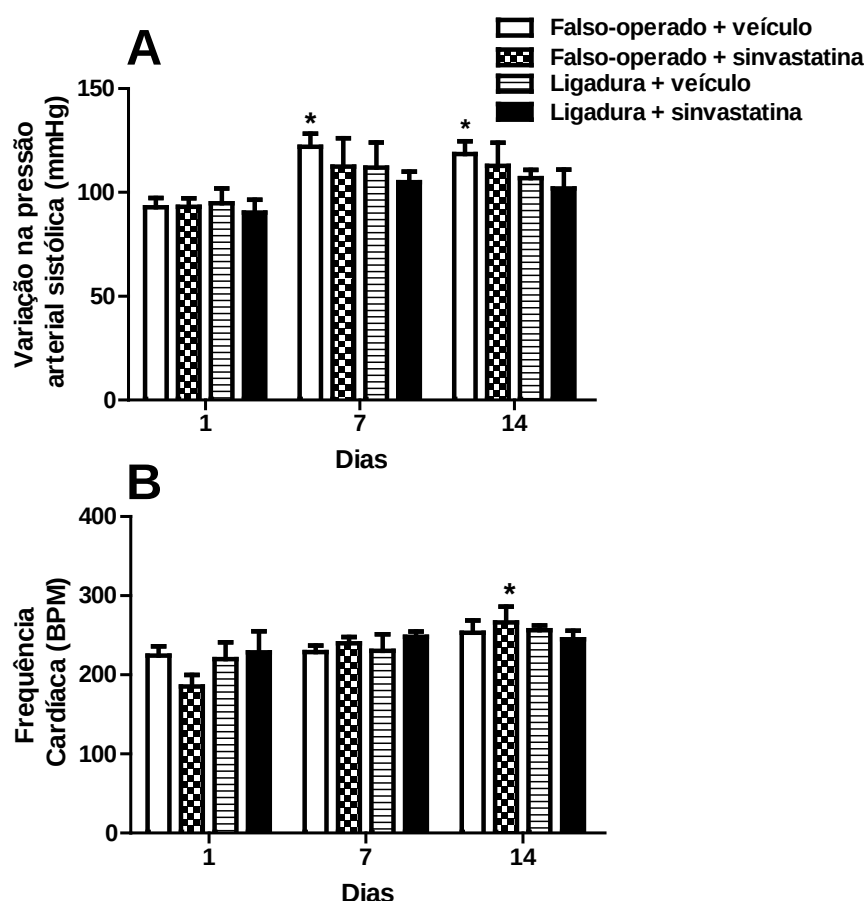


Os ratos foram tratados com sinvastatina (10 mg/kg/dia, v.o.) ou veículo (água, 100 µL/100g, v.o.) a partir do décimo quarto dia após a colocação das ligaduras ou da falsa-cirurgia. Após 7 dias de tratamento os animais foram preparados para registro da pressão arterial média, sistólica e diastólica basal. As barras representam a média e as 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 ligadura sinvastatina).

Durante o experimento foram avaliados temporalmente os efeitos da periodontite e da sinvastatina na pressão arterial sistólica e frequência cardíaca

(*Taill Cuff*). Como pode ser observado na figura 15, painel A, no sétimo e décimo quarto dia foi observado um aumento da pressão arterial sistólica do grupo falso-operado veículo em relação ao primeiro dia. Na frequência cardíaca, foi observado um aumento no décimo quarto dia no grupo falso-operado sinvastatina em relação ao primeiro dia (figura 15, painel B). Entretanto não houve diferença entre os grupos dentro de cada um dos tempos avaliados.

Figura 15. Avaliação temporal da periodontite e da sinvastatina em parâmetros cardiovasculares não invasivos (*Taill Cuff*).



Nos dias do experimento, os animais serão colocados no contensor, em seguida o manguito do *Tail cuff* é encaixado para determinação da frequência cardíaca e da pressão arterial sistólica. A avaliação ocorreu nos dias 1, 7 e 14. As barras representam à média e as 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. (A – * $p < 0.05$, grupo falso-operado veículo no sétimo dia em relação ao primeiro dia; B – * $p < 0.05$, grupo falso-operado sinvastatina no décimo quarto dia em relação ao primeiro dia).

6. DISCUSSÕES

A periodontite é uma doença inflamatória que está sendo considerado um fator de risco para complicações cardiovasculares (HIGASHI et al., 2008; EKUNI et al., 2009). Estudos observacionais (HUNG et al., 2003; TONETTI et al., 2007) e contínuas meta-análises (KHADER et al., 2004; BAHEKAR et al., 2007; JANKET et al., 2003) sugerem um aumento significativo de indivíduos com risco de DVCs, principalmente aterosclerose e hipertensão, entre pessoas com doença periodontal. O efeito da periodontite na pressão arterial deve-se a generalização sistêmica da inflamação local que leva a alterações na célula endotelial (HARASZTHY et al., 2000; STELZEL et al., 2002; KOWOLIK et al., 2001). O dano ao endotélio é o primeiro passo para o desenvolvimento de eventos ateroscleróticos e consequentemente para complicações cardiovasculares (GIANNOTTI E LANDMESSER, 2007; PANZA et al., 1990; CREAGER, 1990). Dentro deste contexto, estudos com as estatinas exibem de forma comprovada benefícios clínicos não diretamente relacionados à inibição da síntese do colesterol (KANSUI et al., 2005; GELOSA et al., 2007). Os efeitos pleiotrópicos, atualmente muito estudados, (VAN WISSEN et al., 2002; RESCH et al., 2006; MASON et al., 2006) estão intimamente relacionados à reversão da disfunção endotelial e melhora do quadro clínico inflamatório (LIAO, LAUFS, 2005).

Nas últimas décadas a sinvastatina tem se destacado como uma das estratégias mais efetivas para a redução dos riscos de DVCs, em níveis primários e secundários (LAUFS, LIAO, 2000; LINARELLI, POTT Jr, 2008). Em nosso estudo optamos pelo uso da sinvastatina por se tratar do fármaco mais indicado na classe (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009) e também o que possui os

principais trabalhos publicados relacionados aos efeitos pleiotrópicos, dentre eles efeitos na função endotelial (ATAR et al., 2006; BERTOLAMI, 1995; CARAMORI, ZAGO, 2000).

Em nosso estudo a dose de sinvastatina foi escolhida baseada na literatura (JORGE, 2005; HERNANDEZ-PERERA et al., 1998; FAJARDO et al., 2010; CHEN, XU, WANG, 2004). Pelo fato da maioria dos trabalhos não se preocupar com níveis tóxicos do uso da sinvastatina em animais, realizamos alguns testes a fim de avaliar a dose escolhida. A dose padronizada alterou no sétimo dia a locomoção dos ratos no teste de campo aberto, podendo indicar uma lesão tecidual. Assim, para confirmar este dado, foi realizado o teste de CK-NAC. Sabe-se que um dos principais efeitos adversos das estatinas é rabdomiólise, que é o dano do músculo esquelético (HOHENEGGER, 2012). A quantificação de CK-NAC é uma forma de avaliar essa doença. Nossos dados mostram que a dose padronizada de sinvastatina não alterou o tecido muscular dos animais tratados. O resultado encontrado no teste de campo aberto, de forma isolada, pode estar relacionado com fatores externos, por exemplo, ansiedade e/ou stress do animal.

Os modelos experimentais com animais têm sido importantes na compreensão da fisiopatologia da periodontite. Estes modelos podem contribuir também para compreensão da relação entre periodontite e alterações sistêmicas (HOLZHAUSEN et al., 2005; AZOUBEL et al., 2007). Recentemente, por exemplo, Herrera et al (2011) mostraram a influência da periodontite sobre alterações cardiorrenais. Esta relação está intimamente relacionada com a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico. Desta forma, a pesquisa a fim de avaliar a resposta do organismo diante de um

quadro patológico utilizando modelos animais é criticamente importante na análise da doença bem como para o desenvolvimento de novas terapias (HERRERA et al., 2011). E ao contrário do que ocorre em humanos, em que a doença periodontal pode levar anos para atingir proporções maiores de inflamação, em modelos animais a doença periodontal progride para uma destruição crônica dos tecidos em poucas semanas (OZ, PULEO, 2011). Isto consiste numa grande vantagem, por otimizar as pesquisas.

O rato, animal que utilizamos em nosso experimento, é o roedor mais utilizado no estudo da patogenia da doença periodontal. Alternativas para a indução da periodontite nos animais são a colocação de ligaduras e/ou a inoculação de periodontopatógenos (OZ, PULEO, 2011). A maioria dos trabalhos com modelos de indução de periodontite através de ligaduras reporta a utilização de uma ou duas ligaduras (AZOUBEL et al., 2007, HOLZHAUSEN et al., 2002, HOLZHAUSEN et al., 2005; SOUZA et al., 2011), visto que a finalidade desses estudos foi avaliar os efeitos locais da periodontite sobre a perda óssea alveolar.

Estudos prévios de nosso laboratório, não foram observados alterações sistêmicas com uma ligadura; portanto se optou pela colocação das mesmas em quatro molares de modo a proporcionar uma inflamação de maior magnitude (MENDES et al., 2011; BRITO, et al., 2011). Portanto, para o presente estudo optou-se pela colocação de quatro ligaduras porque o objetivo foi analisar alterações sistêmicas decorrentes da doença. Como ainda não existiam estudos que demonstrassem o efeito da colocação de quatro ligaduras no comportamento diário dos ratos, avaliou-se o efeito na alimentação e no peso deles. E como constatado em nosso experimento, a ligadura não

influenciou na alimentação dos ratos bem como em seu peso. Consiste num modelo válido, já consagrado na literatura, e que comprovadamente induz uma inflamação que se assemelha à periodontite humana (HOLZHAUSEN et al., 2002, HOLZHAUSEN et al., 2005).

A partir de 7 dias da colocação das ligaduras já se observa significativa perda óssea, porém esta se torna mais marcante a partir do décimo quarto dia (HERRERA et al. 2011). Além disso, alguns estudos (QUEIROZ-JR et al., 2009) bem como dados preliminares do nosso laboratório, mostram que alterações sistêmicas decorrentes da periodontite animal têm um pico de ocorrência em torno da segunda semana de indução da doença (BRITO et al., 2011). Portanto, como o objetivo deste estudo foi avaliar alterações sistêmicas, a sinvastatina começou a ser administrada apenas no dia 8 após a colocação das ligaduras. Todas as análises foram realizadas no décimo quarto dia de experimento.

Para avaliar a função endotelial foram utilizados dois diferentes vasodilatadores devido aos distintos mecanismos de ação. A acetilcolina exerce sua função por meio de receptor acoplado à membrana da célula endotelial. Desta maneira, estimula a própria célula endotelial a produzir NO, que atua sobre a célula do músculo liso e promove vasodilatação. O nitroprussiato de sódio, por sua vez, promove vasodilatação independentemente do endotélio, liberando NO diretamente para célula de músculo liso vascular. Em nosso estudo, foi possível evidenciar uma diminuição da resposta vasodilatadora da acetilcolina no grupo ligadura. Essa redução na resposta de um agente dependente de endotélio evidência uma disfunção endotelial induzida pela periodontite. Recentemente, nosso grupo de

trabalho caracterizou o dano ao endotélio em ratos após quatorze dias de indução da periodontite (BRITO, et al., 2011). Em contrapartida, foi evidenciada uma melhora da resposta vasodilatadora no grupo ligadura que recebeu sinvastatina. Não foi encontrado alterações na resposta da pressão arterial ao nitroprussiato de sódio, indicando que a sinalização do músculo liso mediada pela via GMPc permaneceu inalterada.

A caracterização da disfunção endotelial já foi evidenciada em alguns trabalhos em humanos com periodontite (MERCANOGLU et al., 2004; HIGASHI et al., 2008; HIGASHI et al., 2009; TONETTI et al., 2007; AMAR et al., 2003). Dados recentes sugerem que a inflamação sistêmica e a diminuição da biodisponibilidade de NO são, em parte, a causa da disfunção endotelial, passo inicial para riscos cardiovasculares (HIGASHI et al., 2008; HIGASHI et al., 2009). Dados sobre a desregulação vascular associada a periodontite tem sido consistentemente relatados (SITIA et al., 2010; AMAR et al., 2003). Entre esses estudos foi possível identificar o prejuízo no endotélio mediado por dilatação da artéria braquial em pacientes saudáveis e com periodontite grave, com uma tendência para uma correlação inversa com processos inflamatórios (AMAR et al., 2003). Assim, podemos afirmar que os dados encontrados em nossos experimentos confirmam os dados apresentados nos trabalhos com humanos.

A disfunção endotelial observada concorda com estudos anteriores que mostram um aumento de peroxidação lipídica na aorta de animais com periodontite induzida por ligadura (EKUNI et al., 2009). A inflamação vascular e o consequente estresse oxidativo gerado nesta condição podem afetar a reatividade vascular (SPIEKERMANN, LANDMESSER, DIKALOV, 2003;

HAMILTON et al., 2001). O estresse oxidativo pode estar diretamente relacionado com a hipertensão, uma vez que EROS podem ser considerados mediadores de vasoconstrição e inflamação vascular, afetando a biodisponibilidade de NO (GUZIK et al., 2000; CARDILLO et al., 1997).

Ainda, observamos uma melhora da função endotelial nos ratos com doença periodontal tratados com sinvastatina. Esses dados demonstram a capacidade da sinvastatina de melhorar a resposta vasodilatadora dependente de endotélio. A redução do NO caracteriza uma disfunção endotelial que por sua vez pode ser desencadeada pela resposta inflamatória sistêmica (PEREIRA, 2011; TAN et al., 2002). Tal resposta inflamatória pode não ser suficiente a ponto de induzir a expressão de NOS-2, porém pode ser suficiente para gerar dano na célula do endotélio, e deste modo reduzir a produção de NO pelo NOS-3 (VERMA et al., 2002).

Além disso, foi evidenciada uma diminuição da pressão arterial média basal nos mesmos ratos que tiveram um aumento do relaxamento da vasculatura do endotélio. Esses mesmos dados não foram reportados no método não-invasivo (*Taill Cuff*).

Múltiplas substâncias inflamatórias e/ou pró-trombóticas originárias de processos inflamatórios crônicos ou agudos provocam alterações na vasodilatação dependente de endotélio (HINGORANI et al., 2000). Diversos estudos populacionais (CHRYSOHOOU, PITSAVOS, PANAGIOTAKOS, 2004) e dados experimentais demonstram que os mediadores inflamatórios estão diretamente associados a hipertensão e são encontrados na periodontite

moderada a grave (NAKAJIMA, YAMAZAKI, 2009) mas, no entanto, estas alterações escapam da atenção clínica (SESSO, BURING, RAFAI, 2003).

Atualmente a PCR e a IL-6 constituem um dos principais marcadores inflamatórios associados a disfunção endotelial (RIDKER et al., 2000). Trabalhos já demonstraram que tanto a PCR quanto a IL-6 são marcadores que podem prever o desenvolvimento de hipertensão e tem sido consistentemente relatado em pacientes com periodontite moderada a grave (SLADE et al, 2003). Alterações na sobrevivência das células endoteliais progenitoras e na diferenciação celular também estão associadas a PCR (VERMA et al., 2002). Pacientes com níveis elevados desta proteína apresentam disfunção na reatividade vascular dependente do endotélio (DANESH, PEPYS, 2009). Nossos dados demonstram um potencial efeito da sinvastatina na redução da expressão destes mediadores inflamatórios. Os grupos tratados apresentaram uma considerável diminuição dos níveis de PCR e IL-6. Trabalhos *in vitro* revelaram que a sinvastatina reduz a produção de citocinas IL-6 e IL-8 (SAKODA et al. 2006). A supressão da inflamação por meio de tratamento com estatina reduz a produção de PCR (GONZALVEZ et al., 2004). Estes efeitos resultaram em grande parte dos efeitos pleiotrópicos das estatinas (ATAR et al., 2006).

Interessantemente, conseguimos demonstrar que a periodontite está associada à leucocitose, linfocitose e neutrofilia. Dados semelhantes foram encontrados em estudos onde pacientes com piora na resposta inflamatória endotelial apresentavam alterações hematológicas (CAPOROSSO et al., 2010; TONETTI et al., 2007). E ainda, em nosso estudo a sinvastatina impediu a linfocitose nos animais com periodontite. Pacientes com doença periodontal

exibem maior contagem de leucócitos, embora não necessariamente associado com níveis alterados de pressão arterial (RENVERT, PERSSON, 2002). Estudos já demonstraram os efeitos benéficos das estatinas, ao diminuir a aderência de moléculas, tais como monócitos e leucócitos (FISCHETTI et al., 2004; WEITZ-SCHMIDT et al., 2001).

Adicionalmente a esses efeitos, foi encontrado um aumento nos níveis de colesterol, LDL e VLDL nos ratos com periodontite. A correlação entre doença periodontal e piora do quadro aterosclerótico já foi abordada anteriormente (MONTEIRO et al., 2009; MUSTAPHA, et al., 2007; GENCTOY et al., 2007). Estudos demonstram que a periodontite pode aumentar os níveis de colesterol, LDL, triglicerídeos (MONTEIRO et al., 2009). Alguns grupos mostraram que níveis aumentados de colesterol e LDL foram encontrados em pacientes entre 50 e 60 anos com periodontite moderada em comparação com pacientes na mesma faixa etária (LOSCHKE et al., 2000). E ainda trabalhos relatam que um aumento de IL-6 e PCR está relacionado com uma piora do perfil lipídico e consequentemente podendo contribuir com um aumento dos riscos cardiovasculares (FENTOGLU et al., 2011; LIBBY, RIDKER, MASERI, 2002).

Como encontrado em nosso estudo, a sinvastatina preveniu a piora do perfil lipídico induzido pela doença periodontal. Desta forma, a melhora do perfil lipídico nos grupos tratados com sinvastatina está não apenas correlacionado com a inibição direta da síntese do colesterol, como possivelmente também com a melhora no quadro inflamatório induzido pela periodontite. Esses efeitos referem-se à proteção endotelial, à redução da peroxidação lipídica e ao controle da reação inflamatória e da hemostasia vascular.

Em conjunto, estas alterações vasculares induzidas por um modelo experimental de periodontite fornecem uma importante relação da sinvastatina com a melhora da função endotelial. Também é importante salientar que pode haver outros potenciais caminhos subjacentes à associação entre a periodontite e aumento do risco de DCVs, e mais estudos são necessários para esclarecer o papel da periodontite na etiologia e desenvolvimento de DCVs.

Além dos benefícios cardiovasculares já discutidos, as estatinas tem demonstrado efeito sobre a formação óssea. Modelos experimentais já descreveram o papel tópico das estatinas na doença periodontal (SETO et al., 2008; WU, LIU, ZANG, 2008; LINDY et al., 2008). Esses estudos já comprovaram por mecanismos de ação a atividade tópica, mas ainda há uma janela quanto a atividade das estatinas por via oral em doenças periodontais. Em nosso estudo foi possível caracterizar uma diminuição da perda óssea alveolar nos animais tratados por via oral com sinvastatina. Assim, nosso trabalho vai ao encontro dos trabalhos anteriores, mostrando que a administração por gavagem de sinvastatina pode reduzir a perda óssea alveolar induzida pela periodontite. Além da diminuição da perda óssea, a sinvastatina por via oral possui o benefício sistêmico.

Modelos já foram utilizados na tentativa de definir mecanismos e vias utilizadas pelas estatinas para induzir o crescimento ósseo (LIN et al., 2009; CHEN et al., 2011; FAJARDO et al., 2010). Uma hipótese estabelecida é que a sinvastatina pode mediar a produção de BMP-2, NO e COX-2 na região, os quais levariam a formação óssea na região da mandíbula (BRADLEY et al., 2007). Os osteoblastos são células primárias responsáveis pela formação do osso alveolar (HORIUCHI, MAEDA, 2006). Alguns estudos já mostraram que

as estatinas promovem a diferenciação de células osteoblásticas (HAN et al., 2010). Mundy et al. analisaram que estatinas lipofílicas podem ativar a BMP-2 em culturas de células. Este achado mostra que a BMP-2 promovida na região é capaz de iniciar uma cascata na diferenciação osteoblástica (MUNDY et al., 1999).

Outra via possível de ação é na atividade das moléculas RANKL, RANK e OPG (STEIN et al., 2011). Em um estudo recente foi demonstrado que o papel das estatinas, principalmente a atorvastatina e a sinvastatina podem influenciar a produção de RANKL e OPG e favorecer a formação óssea, em condições não-inflamatórias (STEIN et al., 2011). Masuzaki et al. avaliaram o efeito da sinvastatina em ratos com defeitos ósseos induzidos. Após cinco dias de tratamento, a expressão de RANKL estava diminuída como também a de osteoclastos, enquanto que uma nova formação óssea foi superior quando comparada com o grupo controle (MASUZAKI et al., 2010).

A sinvastatina mostrou em nosso trabalho ser capaz de prevenir a perda óssea alveolar, inflamação sistêmica e consequentes alterações cardiovasculares desencadeadas pela doença periodontal. Doenças inflamatórias estão emergindo como fatores de riscos associados a complicações cardiovasculares futuras, como por exemplo artrite reumatóide, psoríase e a periodontite. E tanto a artrite reumatóide como a periodontite apresentam como característica comum a perda óssea. Portanto o presente trabalho sugere que a sinvastatina é um fármaco capaz de produzir efeitos pleiotrópicos sistêmicos antiinflamatórios e na melhora da função endotelial no sistema cardiovascular e na perda óssea alveolar.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O método de colocação de ligaduras e a dose escolhida de sinvastatina não influenciaram no comportamento diário dos ratos, e consequentemente no experimento.
- A sinvastatina aumenta a resposta vasodilatadora endotélio-dependente (acetilcolina) em animais com periodontite.
- As alterações vasculares induzidas pelo tratamento com sinvastatina foram associadas com uma diminuição do perfil lipídico, linfocitário e marcadores inflamatórios IL-6 e PCR, que são tradicionalmente associados com o DCVs.
- A administração da sinvastatina nos animais com periodontite diminuiu a perda óssea alveolar.
- Nossos dados mostram que a sinvastatina reduz a perda óssea, inflamação sistêmica e o dano ao endotélio induzidos pela periodontite. Desta forma, a sinvastatina pode ser considerada uma droga promissora para o tratamento da doença periodontal e prevenção de complicações cardiovasculares.

8. REFERÊNCIAS

- ACHONG, R. et al. Membrane type (MT) 1- matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 expression in ligature-induced periodontitis in the rat. **Journal of Periodontology**, v.74, n.04, p.494-500, 2003.
- AHN, K.S. et al. Simvastatin, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, suppresses osteoclastogenesis induced by receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand through modulation of NF-kappa B pathway. **International Journal of Cancer**, v.123, p.1733-1740, 2008.
- AMAR, S. et al. Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.23, p.1245-1249, 2003.
- ASCHOFF, A. et al. Pioglitazone prevents capillary rarefaction in streptozotocin-diabetic rats independently of glucose control and vascular endothelial growth factor expression. **Journal of Vascular Research**, v.49, n.03, p.260-266, 2012.
- ATAR, S. et al. Atorvastatin-induced cardioprotection is mediated by increasing inducible nitric oxide synthase and consequent S-nitrosylation of cyclooxygenase-2. **American Journal Physiology - Heart Circulatory Physiology**, v.290, p.1960-1968, 2006.
- AZOUBEL, M.C. et al. Comparison of etoricoxib and indomethacin for the treatment of experimental periodontitis in rats. **Brazilian Journal of Medicine Biology Research**, v.40, n.01, p.117-125, 2007.
- AYUKAWA, Y. et al. Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. **Oral surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, Endodontics**, v.107, p.336-342, 2009.
- BAHEKAR, A.A. et al. The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. **American Heart Journal**, v.154, n.05, p.830-837, 2007.
- BANACH, M. et al. Time for new indications for statins. **Medical Science Monitor**, v.15, p.1-5, 2009.
- BERTOLAMI, M.C. Dislipidemias e alterações endoteliais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.65, n.03, p.267-272, 1995.
- BIRNBAUM, Y; YE, Y; LIN, Y. Augmentation of myocardial production of 15-epi-lipoxin-A4 by pioglitazone and atorvastatin in the rat. **Circulation**, v.114, p.929–935, 2006.
- BJORNSSON, M.J. et al. The influence of diet consistence, drinking water and bedding on periodontal disease in Sprague-Dawley rats. **Journal of Periodontology Research**, v.38, n.06, p.543-550, 2003.

BRADLEY, J.D. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor reduces simvastatin-induced bone morphogenetic protein-2 and bone formation in vivo. **Journal of Periodontal Research**, v.42, p.267-273, 2007.

BRITO, L.W; **Avaliação temporal da função endotelial de ratos com periodontite induzidas por ligadura**. 2011. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, 2011.

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

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

CAI, H; HARRISON, D.G; Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation Research**, v.87, p.840-844, 2001.

CAPOROSSO, L.S. et al. Effect of two models of stress associated with ligature-induced periodontitis on hematological parameters in rats. **Revista Odontológica**, v.25, n.04, p.371-375, 2010.

CARAMORI, P.R.A; ZAGO, A.J. Disfunção endotelial e doença arterial coronariana. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.75, n.02, p.163-172, 2000.

CARDILLO, C. et al. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. **Hypertension**, v.30, p.57-63, 1997.

CARRANZA, A. et al. Lipopolysaccharide (LPS) induction of nitric oxide synthase-2 and cyclooxygenase-2 is impaired in fructose overloaded rats. **Life Science**, v.88, n.08, p.307-313, 2010.

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

CHEN, M.S; XU, F.P; WANG, Y.Z. Statins initiated after hypertrophy inhibit oxidative stress and prevent heart failure in rats with aortic stenosis. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.37, p.889-896, 2004.

CHEN, P.Y. et al. Simvastatin promotes osteoblast viability and differentiation via Ras/Smad/Erk/BMP-2 signaling pathway. **Nutrition Research**, v.30, p.191-199, 2010.

CHEN, S. et al. Effects of simvastatin gel on bone regeneration in alveolar defects in miniature pigs. **Chinese Medical Journal**, v.124, n.23, p.3958-3953, 2011.

CHRYSOHOOU, C; PITSAVOS, C; PANAGIOTAKOS, D.B. Association between prehypertension status and inflammatory markers related to atherosclerotic disease: the ATTICA study. **American Journal Hypertension**, v.17, p.568-573, 2004.

CORSINI, A. et al. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. **Pharmacology & Therapeutics**, v.84, p.413-428, 1999.

CREAGER, M.A. et al. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. **Journal Clinical Investigation**, v.86, p.228-234, 1990.

DANESH, J; PEPYS, M.B; C-reactive protein and coronary disease – is there a casual link? **Circulation**, v.120, p.2036-2039, 2009.

DAUPHINEE, S.M; KARSAN, A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. **Laboratory Investigation**, v.86, p.09-22, 2006.

DAVIGNON, J; LEITER, L.A. Ongoing clinical trials of the pleiotropic effects of statins. **Vascular health and risk**. v.01, n.01, p.29-40, 2005.

DEMMER, R.T; DESVARIEUX, M; Periodontal infections and cardiovascular disease – the heart of matter. **Journal American Dental Association**, v.137, n.10, p.14-20, 2006.

DEMMER, R.T. et al. Refining exposure definitions for studies of periodontal disease and systemic disease associations. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v.36, n.6, p.493-502, 2008.

DUMITRESCU, A.L. et al. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. **Journal Clinical Periodontology**, v.31, n.08, p.596-603, 2004.

ENDO, A. A historical perspective on the discovery of statins. **Proceedings Japanese Physiology Biology Science**, v. 86, n.5, p. 484-493, 2010.

EKUNI, D. et al. Periodontitis-induced lipid peroxidation in rat descending aorta is involved in the initiation of atherosclerosis. **Periodontal Research**, v.44, n.04, p.434-442, 2009.

ESPER, R.J. et al. Endothelial dysfunction: A comprehensive appraisal. **Cardiovascular Diabetology**, v.05, p.04, 2006.

FAJARDO, M.E. et al. Effect of atorvastatin on chronic periodontitis: a randomized pilot study. **Journal of Clinical Periodontology**, v.37, p.1016-1022, 2010.

FENTOGLU, O. et al. Proinflammatory cytokine levels in association between periodontal disease and hyperlipidaemia. **Journal of Clinical Periodontology**, v.38, p.8-16, 2011.

FISCHETTI, F. et al. Fluvastatin treatment inhibits leucocytes adhesion and extravasation in models of complement-mediated acute inflammation. **Clinical & Experimental Immunology**, v.135, n.02, p.186-193, 2004.

GALVÃO, M.P.A. et al. Methodological considerations on descriptive studies of induce periodontal diseases in rats. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.17, n.01, p.56-62, 2003.

GANZ, P; VITA, J.A. Testing endothelial vasomotor function: nitric oxide, a multipotent molecule. **Circulation**, v.108, p.2049-2053, 2003.

GELOSA, P. et al. The role of HMG-CoA reductase inhibition in endothelial dysfunction and inflammation. **Vascular Health and Risk Management**, v.03, n.05, p.567-577, 2007.

GENCTOY, G. et al. Gingival health status in renal transplant recipients: relationship between systemic inflammation and atherosclerosis. **International Journal of Clinical Practice**, v.61, n.04, p.577-582, 2007.

GHOSH-CHOUDHURY, N; MANDAL, C.C; CHOUDHURY, G.G. Statin-induced Ras activation integrates the phosphatidylinositol 3-kinase signal to Akt and MAPK for bone morphogenetic protein-2 expression in osteoblast differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, p.4983-4993, 2007.

GIANNOTTI, G; LANDMESSER, U. Endothelial dysfunction as an early sign of atherosclerosis. **Herz**, v.32, n.07, p.568-572, 2007.

GIBSON, F.C. et al. Innate immune recognition of invasive bacteria accelerates atherosclerosis in Apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation**, v.109, p.2801-2806, 2004.

GONZALVEZ, M. et al. Efecto de la administracion precoz de pravastatina en los valores de proteína C reactiva y de interleucina 6 en la fase aguda del infarto de miocárdio con elevacion del segmento ST. **Revista Española de Cardiología**. v.57, p.916-923, 2004.

GUZIK, T.J. et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. **Circulation Research**, v.86, p.85-90, 2000.

GRAMMAS, P. Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Journal Neuroinflammation**, v.8, p.26, 2011.

HALCOX, J.P.J; DEANFIELD, J.E. Beyond the laboratoty: Clinical implications for statin pleiotropy. **Circulation**, v.109, p.42-48, 2004.

HAMILTON, C.A. et al. Superoxide excess in hypertension and aging: A common cause of endothelial dysfunction. **Circulation**, v.37, p.529-534, 2001.

HAN, G. et al. Effects of simvastatin on relapse and remodeling of periodontal tissues after tooth movement in rats. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.138, p.550-557, 2010.

HARASZTHY, V.I. et al. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. **Journal of Periodontology**, v.71, p.1554-1560, 2000.

HERNANDEZ-PERERA, O. et al. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. **Journal of Clinical Investigation**, v.101, p.2711-2799, 1998.

HERRERA, B.S. et al. Local and cardiorenal effects of periodontitis in nitric oxide-deficient hypertensive rats. **Archives Oral Biology**, v.56, n.01, p.41-47, 2011.

HIGASHI, Y. et al. Periodontal infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients. **Hypertension**, v.51, n.02, p.446-453, 2008.

HIGASHI, Y. et al. Oral infection-inflammatory pathway, periodontitis, is a risk factor for endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v.206, n.02, p.604-610, 2009.

HINGORANI, A.D. et al. Acute systemic inflammation impairs endothelium-dependent dilatation in humans. **Circulation**, v.102, p.994-999, 2000.

HOHENEGGER, M. Drug induced rhabdomyolysis. **Current Opinion in Pharmacology**, v.12, n.03, p.335-339, 2012.

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

HOLZHAUSEN, M. et al. Protective effects of etoricoxib, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, in experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology Research**, v.40, n.03, p.208-211, 2005.

HORMDEE, D; NAGASAWA, T; KIJ, M. Protein kinase-A-dependent osteoprotegerin production on IL-1 stimulation in human gingival fibroblasts is distinct from periodontal ligament fibroblasts. **Clinical & Experimental Immunology**, v.142, p.490-497, 2005.

HORIUCHI, N; MAEDA, T. Statins and bone metabolism. **Oral Diseases**, v.12, p.85-101, 2006.

HUNG, H.C. et al. Oral health and peripheral arterial disease. **Circulation**, v.107, n.08, p.1152-1157, 2003.

ITURRY-YAMAMOTO, G; ALVES, A.A; PICON, P.D. Propriedades antiaterogênicas do fator relaxante derivado do endotélio (óxido nítrico). **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.67, n.7, p.349-357, 1997.

JANKET, S.J. et al. Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology Endodontic**, v.95, n.05, p.559-569, 2003.

JAVARONI, V; NEVES, M.F. Erectile dysfunction and hypertension: impact on cardiovascular risk and treatment. **International Journal of Hypertension**, v.2012, p.1-11, 2011.

JOHN, S. et al. Rapid improvement of nitric oxide bioavailability after lipid-lowering therapy with cerivastatin within two weeks. **Journal of the American College Cardiology**, v.37, n.1351-1358, 2001.

JORGE, P.A.R. et al. Efeitos da atorvastatina, fluvastatina, pravastatina e simvastatina sobre a função endotelial, a peroxidação lipídica e a aterosclerose aórtica em coelhos hipercolesterolêmicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.84, n.04, 2005.

KANSUI, Y. et al. Effects of fluvastatin on endothelium-derived hyperpolarizing factor- and nitric oxide- mediated relaxations in arteries of hypertensive rats. **Clinical Experimental Pharmacology Physiology**, v.31, p.354-359, 2004.

KHADER, Y.S; ALBASHAIREH, Z.S; ALOMARI, M.A. Periodontal diseases and the risk of coronary heart and cerebrovascular diseases: a meta-analysis. **Journal of Periodontology**, v.75, n.08, p.1046-1053, 2004.

KIM, J; AMAR, S; Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. **Odontology**, v.94, n.01, p.10-21, 2006.

KIM, I.S. et al. Lactone form 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins) stimulate the osteoblastic differentiation of mouse periodontal ligament cells via the ERK pathway. **Journal of Periodontol Research**, v.46, p.204-213, 2011.

KON KOH, K. Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation, and plaque stability. **Cardiovascular Research**, v.47, p.648-657, 2000.

KOWOLIK, M.J. et al. Systemic neutrophil response resulting from dental plaque accumulation. **Journal of Periodontology**, v.72, p.146-151, 2001.

KUREISHI, Y. et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. **Nature Medicine**, v.6, p.1004-1010, 2000.

LACEY, D.L. et al. Osteoprotegerin is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**, v.93, p.165-176, 1998.

LAMSTER, I.B. et al. The relationship of periodontal disease to diseases and disorders at distant sites: communication to health care professionals and patients. **Journal of the American Dental Association**, v.139, p.1389-1397, 2008.

LANDMESSER, U.L.F; HORNIG, B; DREXLER, H; Endothelial function: A critical determinant in atherosclerosis? **Circulation**, v.109, p.27-33, 2004.

LAUFS, U. et al. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. **Circulation**, v.97: 1129-1135, 1998.

LAUFS, U; FATA, V.L; LIO, J.K. Inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase blocks hypoxia-mediated down-regulation of endothelial nitric oxide synthase. **Journal Biololgy Chemistry**, v.272, p.317-325, 1997.

LAUFS, U. Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58, p. 719-731, 2003.

LAUFS, U.; LIAO, J. K. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 10, p. 143-148, 2000.

LINARELLI, M. C. B; POTT Jr., H. Estatina: uma revisão sobre aspectos vasculares. **Revista de Ciências Médicas**, v. 17, n.1, p. 43-52, 2008.

LI, M.D. et al. Porphyromonas gingivalis infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. **Circulation**, v.105, p.861-867, 2002.

LIAO, J. K.; LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 89-118, 2005.

LIBBY, P; RIDKER, P.M; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v.105, n.09, p.1135-1143, 2002.

LIN, S.K. et al. Simvastatin as a Novel Strategy To Alleviate Periapical Lesions. **Basic Research – Biology**, v.35, n.05, p.656-662, 2009.

LINDY, O. et al. Statin use is associated with fewer periodontal lesions: A retrospective study. **BMC Oral Healthy**, v.08, n.16, p.01-07, 2008.

LLAVANERAS, A. et al. A combination of a chemically modified doxycycline and a bisphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats. **Journal of Periodontology**, v.72, n.08, p.1069-1077, 2001.

LLINGWORTH, D.R; TOBERT, J.A. HMG-CoA reductase inhibitors. **Advances in Protein Chemistry**, v.56, p.77-114, 2001.

LOSCHKE, W. et al. Plasma lipid and blood glucose levels in patients with destructive periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v.27, p.537–541, 2000.

MASON, R. P. et al. Active metabolite of atorvastatin inhibits membrane cholesterol domain formation by an antioxidant mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 14, p. 9337-9345, 2006.

MASUZAKI, T. et al. The effect of a single remote injection of statin-impregnated poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres on osteogenesis around titanium implants in rat tibia. **Biomaterials**, v.31, p.3327–3334, 2010.

McGOWN, C.C; BROOKES, Z.L.S. Beneficial effects of statins on the microcirculation during sepsis: the role of nitric oxide. **British Journal of Anaesthesia**, v. 98, n. 2, p. 163-175, 2007.

MENDES, R.T; **Efeitos cardiovasculares da inibição da ciclooxygenases-2 em um modelo experimental de periodontite induzida por ligadura.** 2012. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, 2011.

MERCANOGLU, F. et al. Endothelial dysfunction in patients with chronic periodontitis and its improvement after initial periodontal therapy. **Journal of Periodontology**, v.75, p.1694-1700, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – ANVISA. Estatinas na prevenção primária de eventos cardiovasculares. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde, Ano IV, n.09, 2009.

MONTEIRO, A.M. et al. Cardiovascular disease parameters in periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.80, n.03, p.378-388, 2009.

MUNDY, G. et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science**, v.286, p.1946-1949, 1999.

MUSTAPHA, I.Z. et al. Markers of systemic bacterial exposure in periodontal disease and cardiovascular disease risk: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Periodontology**, v.78, n.12, p.2289-2302, 2007.

NAKA, K.K. et al. Effects of pioglitazone and metformin on vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes treated with sulfonylureas. **Diabetes & Vascular Disease Research**, v.09, n.01, p.52-58, 2012.

NAKAJIMA, T; YAMAZAKI, K. Periodontal disease and risk of atherosclerotic coronary heart disease. **Odontology**, v.97, p.84-91, 2009.

NASSAR, P.O. et al. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. **Journal of Periodontal Research**, v.44, p.479-488, 2009.

NISSEN, S. et al. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis. **JAMA**, v.291, p.1071-1080, 2004.

OTUKI, M.F., PIETROVSKI, E.V., CABRINI, D.A; Topical simvastatin: Preclinical evidence for a treatment of skin inflammatory conditions. **Journal of Dermatological Science**, v.44, p. 45-47, 2006.

OZ, H.S; PULEO, D.A. Animal models for periodontal disease. **Biomed Biotechnology**, p.754-857, 2011.

PAGE, R.C; KORNMAN, K.S. The pathogenesis of human periodontitis: a introduction. **Periodontology 2000**, v.14, p.09-11, 1997.

PAGE R.C, KORNMAN K.S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol 2000**, v.14, p.9-11, 1997.

PAQUETTE, D.W; BRODALA, N; NICHOLS, T.C; Cardiovascular disease, inflammation, and periodontal infection. **Periodontology 2000**, v.44, p.113-126, 2007.

PASCERI, V; WILLERSON, J.T; YEH, Th. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. **Circulation**, v.102, p.2165-2168, 2000.

PEREIRA, R.B. et al. Oral *P.gingivalis* infection alters the vascular reactivity in healthy and spontaneously atherosclerotic mice. **Lipids in Health and Disease**, v.10, p.01-07, 2011.

PUSSINEN, P.J. et al. Systemic exposure to *Porphyromonas gingivalis* predicts incident stroke. **Atherosclerosis**, v.193, n.1, p.222-228, 2007.

QUEIROZ-JR, C.M. et al. Role of systemic and local administration of selective inhibitors of cyclo-oxygenase 1 and 2 in an experimental model of periodontal disease in rats. **Journal of Periodontology Research**, v.44, p.153-160, 2009.

RAFIKOV, R. et al. eNOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. **Journal of Endocrinology**, v.210, p.271-284, 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. **Journal of Clinical Periodontology**, v.29, n.03, p.82-89, 2002.

RESCH, U. Reduction of oxidative stress and modulation of autoantibodies against modified low-density lipoprotein after rosuvastatin therapy. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 262-274, 2006.

RIMBAUD, S. et al. Resveratrol improves survival, hemodynamics and energetic in a rat model of hypertension leading to heart failure. **PLoS One**, v.06, n.10, p.263-291, 2011.

RIDKER, P.M. et al. C-Reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. **New England Journal of Medicine**, v.342, p.836-843, 2000.

RIKITAKE, Y; KIM, HH; HUANG, Z. Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection. **Stroke**, v.36, p.2251-2257, 2005.

RUAN, F; ZHENG, Q; WANG, J. Mechanisms of bone anabolism regulated by statins. **Bioscience Reports**, v.32, p.511-519, 2012.

SAKODA, K. et al. Simvastatin decreases IL-6 and IL-8 production in epithelial cells. **Journal of Dental Research**, v.85, n.06, p.520-523, 2006.

SAMSON, K.T; MINOGUCHI, K; TANAKA, A. Inhibitory effects of fluvastatin on cytokine and chemokine production by peripheral blood mononuclear cells in patients with allergic asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, v.36, p.475-482, 2006.

SAVER, B.G. et al. Are statins associated with decreased tooth loss in chronic periodontitis? **Journal of Clinical Periodontology**, v.34, p.214-219, 2007.

SAXLIN, T. et al. Dual effect of statin medication on periodontium. **Journal of Clinical Periodontology**, v.36, p.997–1003, 2009.

SHAB-BIDAR, S. et al. Regular consumption of vitamin D-fortified yogurt drink (Doogh) improved endothelial biomarkers in subjects with type 2 diabetes: a randomized double-blind clinical trial. **BMC Medicine**, v.24, p.01-10, 2011.

SESSO, H.D; BURING, J.E; RAFAI, N. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. **JAMA**, v.290, p.2945-2951, 2003.

SETO, H. et al. Topical administration of simvastatin recovers alveolar bone loss in rats. **Journal of Periodontol Research**, v.43, p.261–267, 2008.

SINISALO, J. et al. Relation of inflammation to vascular function in patients with coronary heart disease. **Atherosclerosis**, v.149, p.403-411, 2000.

SLADE, G.D. et al. Relationship between periodontal disease and C-reactive protein among adults in the atherosclerosis risk in communities study. **Archives International of Medicine**, v.163, p.1172-1179, 2003.

SPIEKERMANN, S; LANDMESSER, U; DIKALOV, S. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H and oxidase-activity in patients with coronary artery disease. Relation to endothelium dependent vasodilation. **Circulation**, v.107, p.1383-1389, 2003.

SITIA, S. et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v.09, n.12, p.830-834, 2010.

SEYMOUR, G.J. et al. Infection or inflammation: the link between periodontal and cardiovascular diseases. **Future Cardiology**, v.05, n.01, p.05-09, 2009.

SOUZA, D.M. et al. Evaluation of periodontal bone loss in rats for radiographic and morphometric methods. **Brazilian Journal of Periodontology**, v.21, n.03, p.67-73, 2011.

STAPLETON, P.A. et al. Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies. **Journal of Inflammation**, v.07, p.54, 2010.

STEIN, S.H. et al. Statins regulate interleukin-1 β -induced RANKL and osteoprotegerin production by human gingival fibroblasts. **Journal of Periodontal Research**, v.46, p.483-490, 2011.

STELZEL, M. et al. Detection of Porphyromonas gingivalis DNA in aortic tissue by PCR. **Journal of Periodontology**, v.73, p.868-870, 2002.

STOCKINS, B. Efectos pleiotropicos de las estatinas. **Revista Chilena de Cardiologia**, v.28, p.198-201, 2009.

TAN, K.C.B. et al. Effects of angiotensin II receptor antagonist on endothelial vasomotor function and urinary albumin excretion in type 2 diabetic patients

with microalbuminuria. **Diabetes Metabolism Research Reviews**. V.18, n.01, p.71-76, 2002.

TONETTI, M.S. et al. Treatment of periodontitis and endothelial function. **New England Journal of Medicine**, v.356, n.09, p.911-920, 2007.

TSIOUFIS, C. et al. Periodontitis and blood pressure: The concept of dental hypertension. **Atherosclerosis**, v.219, n.01, p.01-09, 2011.

VALLANCE, P; COLLIER, J; BHAGAT, K. Infection, inflammation, and infarction: Does acute endothelial dysfunction provide a link? **Lancet**, v.349, p.1391-1392, 1997.

VAN WISSEN, S; et al. Differential hs-CRP reduction in patients with familial hypercholesterolemia treated with aggressive or conventional statin therapy. **Atherosclerosis**, v. 165, p. 361-366, 2002.

VENUGOPAL, SK. et al. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. **Circulation**, v.106, p.1439-1441, 2002.

VERMA, S. et al. A self-fulfilling prophecy: C-Reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. **Circulation**, v.106, n.913-919, 2002.

VERMA, S; BUCHANAN, M.R; ANDERSON, T.J. Endothelial function testing as a biomarker of vascular disease. **Circulation**, v.108, p.2054-2059, 2003.

VLACHOPOULOS, C. et al. Protective effect of atorvastatin on acute systemic inflammation-induced endothelial dysfunction in hypercholesterolaemic subjects. **European Heart Journal**, v.28, p.2102-2109, 2007.

WEITZ-SCHMIDT, G. et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. **Nature Medicine**. V.07, n.06, p.687-692, 2001.

WU, Z; LIU, C; ZANG, G. The effect of simvastatin on remodelling of the alveolar bone following tooth extraction. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.37, p.170–176, 2008.

YAMMOTO, A.; SUDO, H.; ENDO, A. Therapeutic effects of ml-236b in primary hypercholesterolemia. **Atherosclerosis supplements**, v. 5, n.3, p. 43-50, 2004.

YE, Y. et al. Low-dose aspirin augments the infarct size-limiting effects of simvastatin. **American Journal Physiology – Heart Circulatory Physiology**. v.290, n.05, p.1960-1968, 2006.

YE, Y; LIN, Y; ATAR, S. Myocardial protection by pioglitazone, atorvastatin, and their combination: mechanisms and possible interactions. **Pharmacology**, v.87, p.61-67, 2000.

YUDKIN, J.S; STEHOUWER, C.D.A; COPPACK, E.S.W. C-Reactive protein in healthy subjects: Association with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction – A potential role for cytokines originating from adipose tissue? **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.19, p.972-978, 1999.

YASUNARI, K; MAEDA, K; MINAMI, M. HMG-CoA reductase inhibitors prevent migration of human coronary smooth muscle cells through suppression of increase in oxidative stress. **Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.21, n.06, p.937-942, 2001.

ZEPEDA, R.J. et al. Effect of Carvedilol and Nebivolol on Oxidative Stress-related Parameters and Endothelial Function in Patients with Essential Hypertension. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.111, n.05, p.309-316, 2012.