

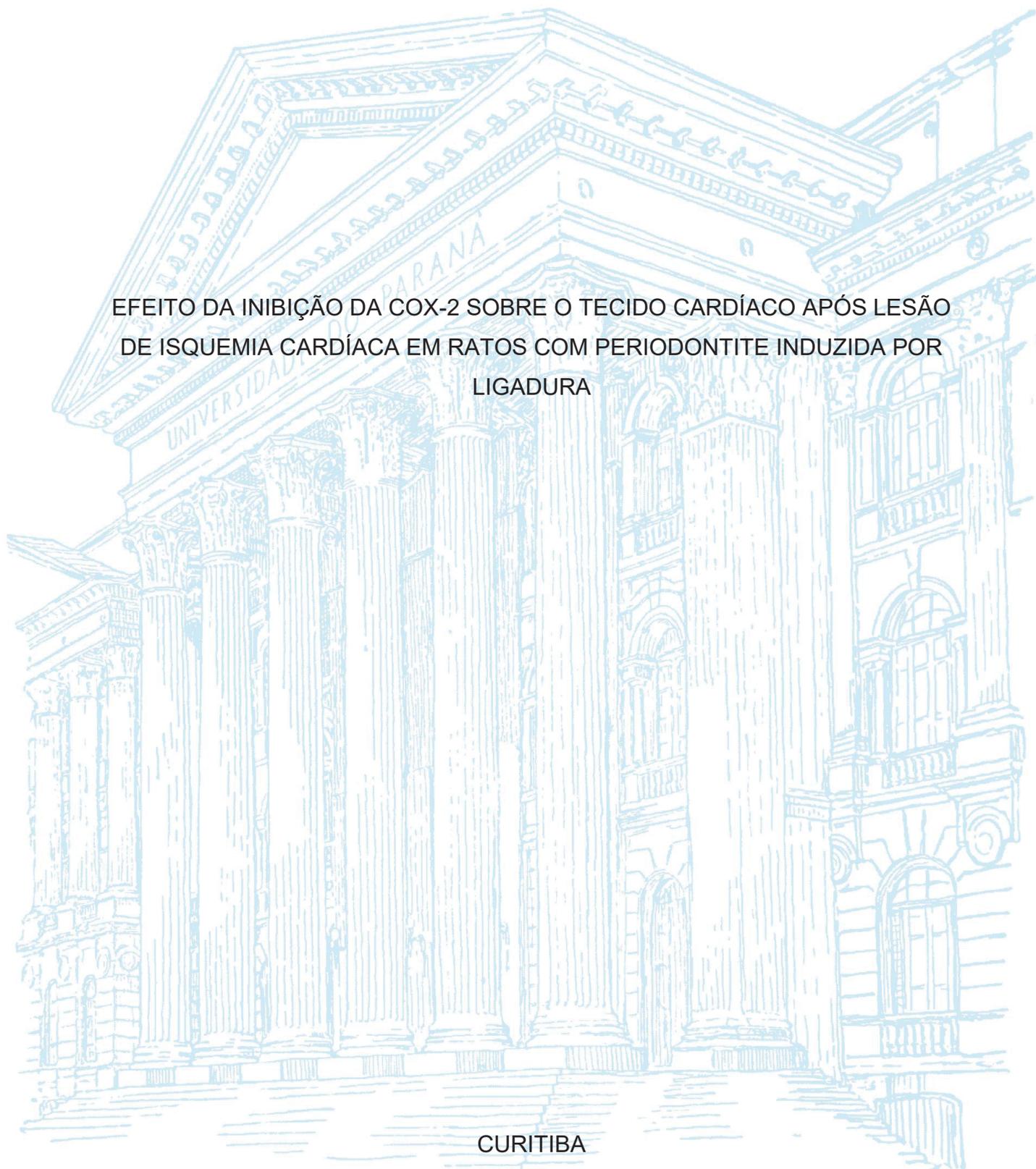
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CRISTIANE ROSA FINGER

EFEITO DA INIBIÇÃO DA COX-2 SOBRE O TECIDO CARDÍACO APÓS LESÃO
DE ISQUEMIA CARDÍACA EM RATOS COM PERIODONTITE INDUZIDA POR
LIGADURA

CURITIBA

2023



CRISTIANE ROSA FINGER

EFEITO DA INIBIÇÃO DA COX-2 SOBRE O TECIDO CARDÍACO APÓS LESÃO
DE ISQUEMIA CARDÍACA EM RATOS COM PERIODONTITE INDUZIDA POR
LIGADURA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nível Mestrado, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica – Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Reila Tainá Mendes.
Coorientador: Prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz Filho.

CURITIBA

2023

Finger, Cristiane Rosa

Efeito da inibição da COX-2 sobre o tecido cardíaco após lesão de isquemia cardíaca em ratos com periodontite induzida por ligadura [recurso eletrônico] / Cristiane Rosa Finger – Curitiba, 2023.

1 recurso online : PDF

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2023.

Orientador: Profa. Dra. Reila Taina Mendes

Coorientador: Prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz Filho

1. Periodontite. 2. Doenças cardiovasculares. 3. Óxido nítrico. I. Mendes, Reila Taina. II. Schwartz Filho, Humberto Osvaldo. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 617.632



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ODONTOLOGIA -
40001016065P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ODONTOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CRISTIANE ROSA FINGER** intitulada: **Efeito da inibição da COX-2 sobre o tecido cardíaco após lesão de isquemia cardíaca em ratos com periodontite induzida por ligadura**, sob orientação da Profa. Dra. **REILA TAINA MENDES**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita a homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 02 de Agosto de 2023.

Assinatura Eletrônica

02/08/2023 21:03:20.0

REILA TAINA MENDES

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

02/08/2023 14:52:48.0

JOSÉ MIGUEL AMENÁBAR CÉSPEDES

Avallador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

14/08/2023 13:12:42.0

MICHEL FLEITH OTUKI

Avallador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Aos meus pais, minha amada irmã e meu companheiro, meu coração sempre estará com vocês, onde amor é sincero e inesgotável.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos, por permitir que eu concluísse mais uma etapa da minha vida.

Aos meus Pais, Rosana Modesto e Eurico Finger Junior, pelo exemplo de vida, por sempre estarem ao meu lado, pelo amor incondicional e pela paciência. Por terem feito tudo para me oferecer a oportunidade de estudar, acreditando e respeitando minhas decisões e nunca deixando as dificuldades interferirem em meus planos. Agradeço a dedicação e amor recebido sempre.

A minha amada irmã, Cristiele Rosa Finger, a qual por muitas vezes foi morada para o meu coração aflito durante esses anos, sempre me incentivando e acreditando nos meus sonhos. Minha sincera gratidão pelo seu amor e companheirismo a toda prova.

Ao meu grande amor, amigo, companheiro e confidente Gabriel Muniz, por sempre me apoiar, incentivar e por toda paciência durante toda essa etapa. Sempre compreendendo minhas eventuais ausências.

A minha orientadora, Profa. Dra. Reila Tainá Mendes pela oportunidade de um crescimento científico, por toda sua paciência, compreensão, conselhos ao longo dessa caminhada, professora você é um exemplo de paixão pela pesquisa e docência. Agradeço a Deus por ter colocado você no meu caminho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz-Filho por todo auxílio e conhecimento compartilhado durante esta fase.

Ao Professor Dr. Jayme Bordini Jr., sempre disposto em ajudar e fornecer conhecimentos, sempre com muita paciência e carinho.

Ao Prof. Dr. Heliton Lima, pelas suas contribuições, estas foram de grande valor para o enriquecimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Daniel Fernandes e a UFSC pela parceria na realização das análises de NOx (nitrito e nitrato).

Ao Prof. Dr. Michel Fleith Otuki pela imensa ajuda, nos cedendo seu laboratório para realização dos experimentos.

Às técnicas de laboratório Bruna e Karla, pela imensa contribuição com a parte histológica.

Aos meus colegas de mestrado, Gabriela Keiko Izumi, João Roth, Stefany Duarte, Wellington Bruno Venâncio, pela convivência e por toda cumplicidade nos momentos de angústia, durante esta jornada. Muito obrigada pela amizade.

Aos professores do Programa de Pós-graduação de Odontologia da Universidade Federal do Paraná pelos conhecimentos transmitidos.

Às alunas de iniciação científica que estiveram presentes durante esta pesquisa, Alana Vouk, Leticia Rosa e Nicolly Fior que colaboraram muito, sempre dedicadas e dispostas a apreender.

Ao Programa Pesquisa para o SUS: gestão compartilhada em saúde - PPSUS e FAPESC (Decit/SCTIE/MS, CNPq, FAPESC e da SES-SC) pelo financiamento desta pesquisa.

A todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão desta pesquisa.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não temas, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares.”

(JOSUÉ 1:9)

RESUMO

A Periodontite é uma doença infecto-inflamatória associada a biofilme disbiótico e promove a destruição do aparato de inserção dental. O processo inflamatório que ocorre durante a periodontite se associa a repercussões sistêmicas e a demais doenças crônicas não transmissíveis, dentre elas as doenças cardiovasculares. A periodontite se associa à diminuição da produção de óxido nítrico e consequente disfunção endotelial – a qual é o primeiro sinal de doença cardiovascular. A produção de prostaciclina, um derivado do ácido araquidônico com propriedades vasodilatadoras e antitrombóticas, está associada ao aumento na expressão vascular da COX-2. Sugere-se que a indução de COX-2 nas células endoteliais possa contrabalancear a redução da produção de óxido nítrico. Desta maneira, a inibição da COX-2 na presença de periodontite pode apresentar riscos de complicações cardiovasculares. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de um inibidor seletivo da COX-2, o etoricoxibe, sobre o tecido cardíaco de ratos com periodontite experimental. Foram realizados dois protocolos experimentais, o primeiro protocolo teve como objetivo caracterizar o modelo de periodontite e comparar as alterações locais, plasmáticas e o tecido cardíaco em diferentes tempos experimentais. No dia zero, 18 ratos Wistar machos foram separados randomicamente em 03 grupos: ligadura 14 dias (um fio de algodão foi posicionado na cervical dos primeiros molares inferiores e segundos molares superiores bilateralmente e mantidos durante 14 dias); ligadura 21 dias (ligaduras mantidas por 21 dias) e grupo Sham (falso-operado; as ligaduras foram posicionadas e imediatamente removidas). As eutanásias foram realizadas com 14 e 21 dias. No protocolo 2, 57 ratos Wistar machos foram submetidos ao procedimento de colocação de ligadura para indução de periodontite ou falsa-cirurgia no dia zero. Quatorze dias após o procedimento, os animais foram randomicamente alocados em 04 grupos: Ligadura+etoricoxibe (receberam 10 mg/kg de etoricoxibe v.o. durante 7 dias), ligadura+veículo (receberam água), sham+etoricoxibe (receberam 10 mg/kg de etoricoxibe v.o.) e sham+veículo (receberam água). Um quinto grupo denominado Naive (não submetido a nenhum procedimento) foi utilizado como grupo controle. Nos dias dezoito e vinte, os animais receberam uma injeção de isoprenalina para indução de isquemia cardíaca. Os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica após 21 ou 27 dias da colocação das ligaduras ou falsa cirurgia. Foram coletados os corações para análise histológica, mandíbulas e maxilas para caracterização da periodontite e sangue para as análises plasmáticas. No protocolo 1, os grupos ligadura 14 e 21 dias apresentaram perda óssea estatisticamente significativa comparados ao controle ($p < 0.05$), mas não houve diferença entre si. A quantificação de nitrito e nitrato (NOx) foi reduzida no grupo 14 dias ($p < 0.05$) e retornou a níveis semelhantes ao controle após 21 dias ($p > 0.05$). Os grupos 14 e 21 dias apresentaram aumento no infiltrado inflamatório cardíaco comparados ao controle. A deposição de fibras colágenas foi maior no grupo 21 dias comparado ao grupo Sham ($p < 0.05$). Os níveis de prostaciclina foram maiores no grupo 21 dias comparado ao grupo 14 dias ($p < 0.05$). No protocolo 2, os grupos ligadura apresentaram perda óssea alveolar comparados ao Sham ($p < 0.05$), sem diferenças para os grupos etoricoxibe ou veículo. Os níveis de óxido nítrico foram semelhantes entre os grupos. Na análise qualitativa do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco houve diferença entre o grupo ligadura-etoricoxibe e sham-veículo somente após 27 dias ($p < 0.05$). A deposição de fibras colágenas foi diferente entre os grupos ligadura-etoricoxibe 21 e 27 dias após a indução da periodontite ($p < 0.05$). Não houve diferença entre os grupos nos níveis de prostaglandina. A análise descritiva da detecção de apoptose in situ no tecido cardíaco foi maior nos grupos que receberam etoricoxibe. Desta forma sugere-se que a inibição da COX-2 em um modelo experimental de periodontite possa exacerbar alterações no tecido cardíaco.

Palavras-chave: Periodontite; Doenças Cardiovasculares; Óxido Nítrico; Ciclooxigenase-2.

ABSTRACT

Periodontitis is an infectious-inflammatory disease associated with dysbiotic biofilm and promotes the destruction of the dental insertion apparatus. The inflammatory process that occurs during periodontitis is associated with systemic repercussions and other non-communicable chronic diseases, including cardiovascular diseases. Periodontitis is associated with decreased nitric oxide production and consequent endothelial dysfunction – which is the first sign of cardiovascular disease. The production of prostacyclin, an arachidonic acid derivative with vasodilator and antithrombotic properties, is associated with increased vascular COX-2 expression. It is suggested that the induction of COX-2 in endothelial cells may counteract the reduction in nitric oxide production. Thus, the inhibition of COX-2 in the presence of periodontitis may present risks of cardiovascular complications. The aim of this study was to evaluate the effect of a selective COX-2 inhibitor, etoricoxib, on cardiac tissue in rats with experimental periodontitis. Two experimental protocols were carried out, the first protocol aimed to characterize the periodontitis model and compare local, plasmatic and cardiac tissue changes at different experimental times. On day zero, 18 male Wistar rats were randomly divided into 03 groups: ligation 14 days (a cotton thread was positioned bilaterally on the cervical of the lower first molars and upper second molars and maintained for 14 days); ligation 21 days (ligatures kept for 21 days) and Sham group (false-operated; ligatures were positioned and immediately removed). Euthanasia was performed at 14 or 21 days. In protocol 2, 57 male Wistar rats were submitted to the procedure of placing a ligature to induce periodontitis or sham surgery on day zero. Fourteen days after the procedure, the animals were randomly allocated into 04 groups: Ligature+etoricoxib (received 10 mg/kg of etoricoxib p.o. for 7 days), ligature+vehicle (received water), sham+etoricoxib (received 10 mg/kg of etoricoxib p.o.) and sham+vehicle (received water). A fifth group called Naive (not submitted to any procedure) was used as a control group. On days nineteen and twenty, the animals received an injection of isoprenaline to induce cardiac ischemia. The animals were euthanized with anesthetic overdose 21 or 27 days after placement of ligatures or sham surgery. Hearts were collected for histological analysis, mandibles and maxillae for characterization of periodontitis and blood for plasmatic analyses. In protocol 1, the ligation groups 14 and 21 days showed statistically significant bone loss compared to the control ($p < 0.05$), but there was no difference between them. The quantification of nitrite and nitrate (NOx) was reduced in the 14 days group ($p < 0.05$) and returned to levels similar to the control after 21 days ($p > 0.05$). Groups 14 and 21 days showed an increase in the cardiac inflammatory infiltrate compared to the control, ($p < 0.05$). Collagen fiber deposition was significantly higher in the 21 days group compared to Sham group ($p < 0.05$). Prostacyclin levels were higher in the 21 day group compared to 14 days group ($p < 0.05$). In protocol 2, ligation groups showed alveolar bone loss compared to Sham ($p < 0.05$), with no differences for etoricoxib or vehicle groups. Nitric oxide levels were similar between groups. In the qualitative analysis of the inflammatory infiltrate in the cardiac tissue, there was a difference between the ligature-etoricoxib and sham-vehicle groups only after 27 days ($p < 0.05$), in the quantitative analysis to differentiate the cell type present in the inflammatory infiltrate after 21 days, there was a statistically significant difference only between the sham-vehicle and ligature-etoricoxib groups; after 27 days there was difference between all groups ($p < 0.05$). Collagen fiber deposition was significant different between the ligature-etoricoxib groups 21 and 27 days after periodontitis induction ($p < 0.05$). There was no statistical difference between groups regarding prostaglandin levels. Descriptive analysis of detection of in situ apoptosis in cardiac tissue was greater in groups receiving etoricoxib. Thus, it is suggested that the inhibition of COX-2 in an experimental model of periodontitis may exacerbate cardiac tissue alterations.

Keywords: Periodontitis; Heart Diseases; Oxidative Stress; Cyclooxygenase-2.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CASCATA DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO NA INFLAMAÇÃO.	33
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS EFEITOS RELACIONADOS A INIBIÇÃO DA COX-2.	36
FIGURA 3 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROTOCOLO 1 EXPERIMENTAL.	38
FIGURA 4 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROTOCOLO 2 EXPERIMENTAL.	39
FIGURA 5 – COLOCAÇÃO DAS LIGADURAS NOS RATOS..	41
FIGURA 6 – ADMINISTRAÇÃO DA MEDICAÇÃO OU PLACEBO POR MEIO DE GAVAGEM ORAL..	42
FIGURA 7 – FOTO DO CORAÇÃO FIXADO EM PARAFORMALDEÍDO DE UM ANIMAL SUBMETIDO A INDUÇÃO DE ISQUEMIA CARDÍACA.....	43
FIGURA 8 – DEMONSTRAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO PROGRAMA IMAGE J PARA OBTENÇÃO FVC	45
FIGURA 9 – MAXILARES PREPARADOS PARA AVALIAÇÃO DA PERDA ÓSSEA DO PROTOCOLO 1.....	46
FIGURA 10 – EFEITO DO ETORICOXIBE SOBRE O TECIDO CARDÍACO INFARTADOS COM DOSES SUBCUTÂNEAS DE ISOPRENALINA EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO PROCEDIMENTO DE LIGADURA OU FALSA CIRURGIA.	58
FIGURA 11 – EFEITO DO ETORICOXIBE SOBRE O TECIDO CARDÍACO INFARTADOS COM DOSES SUBCUTÂNEAS DE ISOPRENALINA EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO PROCEDIMENTO DE LIGADURA OU FALSA CIRURGIA..	60
FIGURA 12 – DETECÇÃO DE APOPTOSE IN SITU CARDIOTACS TM NO TECIDO CARDÍACO DE RATOS COM PERIODONTITE EXPERIMENTAL E INDUÇÃO LESÃO ISQUEMICA CARDIACA.	62

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – ESTUDOS QUE AVALIARAM ALTERAÇÕES DO TECIDO CARDÍACO DE ANIMAIS COM PERIODONTITE INDUZIDA.	25
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DADOS ANALISADOS POR ANOVA DE DUAS VIAS SEGUIDA POR POS HOC BONFERRONI.....	55
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AA	- Ácido araquidônico
AAP	- American Academy of Periodontology
AINEs	- Anti-inflamatórios não esteroidais
APPROV	- Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx
AR	- Arteriolar renal
ARRIVE	- Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
AVC	- Acidente vascular cerebral
CEUA	- Comissão de ética no uso animal
CLASS	- Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study
COX	- Ciclooxigenase
COX-2	- Ciclooxigenase-2
COXIBEs	-Anti-inflamatórios não esteroidais inibidores seletivos da COX-2
DAB	- Diamino benzidina
DCNT	- Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	- Doença cardiovascular
DNA	- Deoxyribonucleic acid
EFP	- American Academy of Periodontology
EMA	- European Medicines Agency
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
EROS	- Espécies reativas de oxigênio
FDA	- Food and Drug Administration
FSG	- Fluxo sanguíneo glomerular
FVC	- Fração do volume de colágeno
FVC-T	- Fração do volume de colágeno total
HE	- Hematoxilina e Eosina
IAM	- Infarto Agudo do Miocárdio
ICC	- Insuficiência cardíaca
IL-1	- Interleucina-1
IL-6	- Interleucina-6
IL-8	- Interleucina-8
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzida
IR	- Insuficiência renal

Kg	- Quilograma
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade
L-NAME	- L-NG-Nitro arginine methyl ester
LOX	- Lipooxigenase
LPS	- Lipopolissacarídeo
ml	- Mililitro
nNOS	- Óxido nítrico sintase neuronal
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintase
NOS-1	- Óxido nítrico sintase 1
NOS-2	- Óxido nítrico sintase 2
NOS-3	- Óxido nítrico sintase 3
NOx	- Número de oxidação
PAMPS	- Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	- Phosphate-buffered saline
PCR	- Proteína C-reativa
PG	- Prostaglandina
PGD2	- Prostaglandina D2
PGE2	- Prostaglandina-E2
PGF2 α	- Prostaglandina F2 α
PGG2	- Prostaglandina G2
PGH2	- Prostaglandina H2
PGHS-2	- Prostaglandina Endoperóxido Sintase-2
PGI2	- Prostaciclina
RANK-L	- Receptor activator of nuclear factor-kappa beta ligand
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
SPAS	- Secretaria De Atenção Primária A Saúde
TH1	- T helper 1
TNF	- Fator de necrose tumoral
TXA2	- Tromboxano A2
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
VIGOR	- Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research
WHO	- World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 DOENÇA PERIODONTAL E DOENÇAS CARDIOVASCULARES	21
3.2 ÓXIDO NÍTRICO.....	27
3.3 DOENÇA PERIODONTAL E FUNÇÃO ENDOTELIAL	28
3.4 CICLOOXIGENASES.....	30
3.5 INIBIÇÃO SELETIVA DA COX-2.....	33
3.6 EFEITOS CARDIOVASCULARES DA INIBIÇÃO SELETIVA DA COX-2	34
4 JUSTIFICATIVA	36
5 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 AMOSTRA	37
5.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	37
5.3 INDUÇÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL	40
5.4 INDUÇÃO DE ISQUEMIA CARDÍACA	42
5.5 ADMINISTRAÇÃO DA MEDICAÇÃO	42
5.6 COLETA DE AMOSTRAS	43
5.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	43
5.8 AVALIAÇÃO DA PERDA ÓSSEA: ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	45
5.9 DETECÇÃO DA APOPTOSE IN SITU	46
5.10 ANÁLISE DA PRESENÇA DE ÓXIDO NÍTRICO	48
5.11 DOSAGEM DE PROSTACICLINA	48
5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
6 RESULTADOS	50
6.1 RESULTADOS PROTOCOLO 1	50
6.1.1 Perda óssea alveolar média em um modelo experimental de periodontite	50
6.1.2 Quantificação de nitrito e nitrato (NOx) em um modelo experimental de periodontite	51
6.1.3 Análise histológica cardíaca dos ratos em um modelo experimental de periodontite: descritiva e avaliação qualitativa do infiltrado inflamatório	51

6.1.4 Análise histológica cardíaca dos ratos em um modelo experimental de periodontite: quantificação de fibras colágenas	52
6.1.5 Dosagem de prostaciclina dos ratos em um modelo experimental de periodontite	53
6.2 RESULTADOS: PROTOCOLO 2	54
6.2.1 Curva de mortalidade após a indução de lesão de isquemia cardíaca	54
6.2.2 Perda óssea alveolar média em um modelo experimental de periodontite com inibição de COX-2	55
6.2.3 Quantificação de nitrito e nitrato (NOx) em um modelo experimental de periodontite e indução de lesão isquemia cardíaca	56
6.2.4 Análise histológica cardíaca dos ratos submetidos a lesão de isquemia cardíaca em um modelo experimental de periodontite com inibição de COX-2: análise descritiva e avaliação qualitativa do infiltrado inflamatório	56
6.2.5 Análise histológica cardíaca dos ratos submetidos a lesão de isquemia cardíaca em um modelo experimental de periodontite com inibição de COX-2: quantificação de fibras colágenas	59
6.2.6 Detecção de apoptose in situ no tecido cardíaco de ratos submetidos a lesão de isquemia cardíaca em um modelo experimental de periodontite com inibição de COX-2	62
6.2.7 Dosagem de prostaciclina de ratos submetidos a lesão de isquemia cardíaca em um modelo experimental de periodontite com inibição de COX-2	64
7 DISCUSSÃO	65
8 CONCLUSÃO	74
8 AGRADECIMENTOS	74
REFERÊNCIAS	75
ANEXO 1 – PARECER DE APROVAÇÃO DA COSSIMÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	89

1 INTRODUÇÃO

O termo “doenças periodontais” refere-se ao conjunto de afecções que acometem os tecidos de proteção e sustentação dos elementos dentários, denominado periodonto (MELO; FRAZÃO; JAMELLI et al., 2006). A doença periodontal inicia-se pela inflamação gengival, denominada gengivite. A gengivite é resultado da resposta inflamatória ao acúmulo do biofilme dental e outros fatores irritantes que podem favorecer esse processo. Quando estruturas de suporte dos dentes são envolvidas, tem-se a periodontite (CATTON et al., 2018; SCHÄTZLE et al., 2003). A forma severa da periodontite é considerada a sexta condição crônica que mais ocorre no mundo (TONETTI et al., 2015) e representa, assim, um problema de saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2022).

A periodontite é definida como uma doença inflamatória crônica multifatorial associada a biofilme disbiótico e caracterizada pela destruição progressiva do aparato de inserção dental. Na ausência de tratamento, pode ocorrer a perda dentária (CATTON et al., 2018). A prevalência da periodontite começa no fim da adolescência, e tem seu pico ao redor dos 55 anos de idade. Homens e mulheres são igualmente afetados (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2022). A periodontite é a principal causa de perda de elementos dentais na população adulta. (TONETTI et al., 2015). As características comuns da periodontite incluem inflamação gengival, perda de inserção clínica, evidência radiográfica de perda óssea alveolar, sítios com profundidade de sondagem aumentada, mobilidade, sangramento à sondagem e migração dentária patológica (KWON; LAMSTER; LEVIN, 2021).

A etiologia da periodontite envolve fatores e indicadores de risco já bem explorados na literatura, como fatores ambientais e adquiridos, bem como a genética (LIU, 2022). Além dos efeitos locais da periodontite, a doença também se associa a alterações sistêmicas (JEFFCOAT et al., 2011). É bem estabelecida a relação entre inflamação periodontal e demais condições sistêmicas, como doenças cardiovasculares (PRIYAMVARA et al., 2020; SANZ et al., 2020), diabetes mellitus (GENCO & BORGNAKKE, 2013), doença de Alzheimer (MA et al., 2022), doença renal crônica (DESCHAMPS-LENHARDT et al., 2018), entre outros. Adicionalmente, a doença periodontal faz parte do grupo das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) e compartilha com estas determinantes sociais e fatores de risco que são

responsáveis por cerca de dois terços das mortes, como doença cardiovascular, diabetes, câncer e doenças respiratórias crônicas (TONETTI et al., 2017; EZZATI & RIBOLI, 2012; KASSIER, 2016; KASSEBAUM et al., 2014).

As DCNT são um grupo de condições relacionadas ao estilo de vida moderno que podem ser explicadas pela análise das transições demográficas e epidemiológicas. Incluem doenças como diabetes, doenças respiratórias crônicas, demência, doenças cardiovasculares, cancro, doenças musculoesqueléticas e mentais, mas também doenças congênitas ou neurológicas, doenças genitourinárias, sanguíneas e metabólicas, doenças da pele, dos órgãos sensoriais, do aparelho digestório bem como da cavidade oral (WOLF et al., 2021).

As doenças periodontais e algumas doenças sistêmicas têm fatores genéticos e/ou ambientais similares; portanto, indivíduos afetados imunologicamente podem mostrar manifestações de ambas as condições. Conseqüentemente, a perda dos tecidos periodontais é uma manifestação comum de algumas doenças sistêmicas, e pode significar um importante parâmetro no diagnóstico e nas implicações terapêuticas; além disso, as terapias medicamentosas utilizadas nas diferentes condições sistêmicas podem ter impacto na evolução da doença periodontal (JEPSSEN et al., 2018).

A periodontite gera uma inflamação de baixo grau, o que pode influenciar no desenvolvimento de demais comorbidades (HAJISHENGALLIS et al., 2021). Há evidências robustas de estudos epidemiológicos para uma associação positiva entre periodontite e doença cardíaca coronária (CUNHA; COSTA; MELO CUNHA, 2016), bem como pacientes com periodontite apresentam risco aumentado para hipertensão (AGUILERA et al, 2020).

Embora os mecanismos envolvidos nessas condições ainda não estejam claros, sugere-se que a inflamação sistêmica associada à microbiota presente na doença periodontal pode levar à redução da produção de óxido nítrico, um importante agente vasodilatador e anti-agregante plaquetário produzido pelas células endoteliais, o que expõe os pacientes a um risco aumentado de complicações cardiovasculares (EKUNI et al., 2009). Contrariamente à redução na biodisponibilidade do óxido nítrico, patologias que apresentam um processo inflamatório sistêmico demonstram consistentemente um aumento na atividade vascular da ciclooxygenase-2 (COX-2) (LEUTI et al., 2020). Uma enzima expressa constitutivamente, porém de caráter marcadamente inflamatório. Um dos principais

subprodutos da COX-2 é a prostaciclina (PGI₂), que é um potente agente vasodilatador com a capacidade de aumentar a permeabilidade vascular (PARK; PILLINGER; ABRAMSON, 2006). Desta maneira, tem sido proposto que a indução da COX-2 em células endoteliais possa compensar a diminuição na produção de óxido nítrico.

Desse modo, ao inibir seletivamente a COX-2, pode ocorrer uma redução na quantidade de prostaciclina produzida no endotélio, sem afetar a produção plaquetária de Tromboxano A₂ (TxA₂), o que pode aumentar a propensão à trombose devido ao desequilíbrio dos prostanoídes hemostáticos. (BATLOUNI, 2010; BELUQUE, 2014). Tal desequilíbrio já foi bem documentado na literatura e impulsionou a retirada do mercado de alguns inibidores seletivos da COX-2. A comercialização do rofecoxibe foi suspensa em 2004, seguida pelo valdecoxibe em 2005 devido a complicações cardiovasculares (FITZGERALD, 2004).

No Brasil, apenas o celecoxibe e o etoricoxibe estão disponíveis comercialmente, ambos com receita controlada (Ministério da Saúde, Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 79, de 4 de novembro de 2008), sendo contraindicada a prescrição a pacientes com doenças cardiovasculares (MENDES et al., 2012). No entanto, diante deste cenário questiona-se a segurança do uso de tais fármacos em pacientes que apresentam demais doenças inflamatórias sistêmicas, assim como a periodontite.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inibição da COX-2 em animais com periodontite que passaram por lesão de isquemia cardíaca.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Compreender a relação entre a doença periodontal e inibidores seletivos de COX-2 com o risco de desenvolvimento de doença cardiovascular, em um modelo experimental de periodontite em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as alterações no tecido cardíaco em um modelo de periodontite em ratos após 14 e 21 dias;
- Avaliar o efeito da periodontite e da inibição da COX-2 sobre o infiltrado inflamatório com coloração de Hematoxilina e Eosina em corações de ratos submetidos a isquemia cardíaca induzida por isoprenalina;
- Avaliar o efeito da periodontite e da inibição da COX-2 sobre a presença de fibras colágenas com coloração de Tricrômico de Mallory em corações de ratos com periodontite submetidos a isquemia cardíaca, induzida por isoprenalina;
- Avaliar o efeito da periodontite e da inibição da COX-2 sobre a detecção de apoptose *in situ* no tecido cardíaco de ratos com periodontite, submetidos a isquemia cardíaca induzida por isoprenalina;
- Avaliar o efeito da periodontite e da inibição da COX-2 sobre a prostaciclina no plasma de ratos com periodontite, submetidos a isquemia cardíaca induzida por isoprenalina;
- Avaliar o efeito da periodontite e da inibição da COX-2 sobre a presença de óxido nítrico (NO) no plasma de ratos com periodontite submetidos a isquemia cardíaca induzida por isoprenalina;
- Avaliar o efeito do Etoricoxibe sobre a perda óssea alveolar decorrente da periodontite em animais com periodontite induzida por ligadura, por meio da análise morfométrica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DOENÇA PERIODONTAL E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

A periodontite é uma doença inflamatória crônica associada ao biofilme disbiótico acumulado nas regiões supra e subgingival. A disbiose presente pode desencadear uma resposta inflamatória exacerbada e destrutiva (JEPSEN et al., 2018; MEYLE & CHAPPLE, 2015). A presença desse biofilme disbiótico é essencial para a ocorrência da periodontite. Entretanto, além da influência da microbiota periodontal, outros estressantes ambientais, químicos ou mecânicos podem favorecer a inflamação da cavidade bucal, e podem também desempenhar um papel no desenvolvimento da periodontite. Adicionalmente, o próprio estado de saúde do hospedeiro pode influenciar na exacerbação da resposta inflamatória (HAJISHENGALLIS, 2015).

Quando o indivíduo apresenta uma condição saudável, a resposta imunológica do hospedeiro está equilibrada. Porém, se a presença de periodontopatógenos for aumentada, a resposta imunológica do hospedeiro – que envolve a participação de diversos tipos celulares que produzem uma vasta gama de mediadores químicos e que atuam na modulação local da resposta de defesa em busca do controle da infecção – favorece um estado crônico de inflamação nos tecidos periodontais e pode ocorrer reabsorção óssea alveolar e perda dentária (BEDI, MAHENDRA & AMBALAVANAN, 2015; CARDOSO; REIS; MANZANARES-CÉSPEDES, 2018).

Além dos efeitos locais, evidências mostram que a inflamação relacionada à periodontite apresenta consequências sistêmicas, entre elas, um risco aumentado a doença cardiovascular (DCV), incluindo a aterosclerose e infarto do miocárdio (HOLMLUND & LAMPA, 2017; LIMA et al., 2020; BATISTA et al., 2011). A DCV é um termo genérico utilizado para definir condições patológicas que envolvem o sistema cardiovascular, incluindo o coração, os vasos sanguíneos ou o pericárdio. As doenças cardiovasculares são responsáveis pela morte de 17,9 milhões de pessoas por ano e correspondem à principal causa de morte no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2023).

A aterosclerose faz parte do grupo das DCV e é um processo multifatorial e complexo, sendo uma condição inflamatória vascular crônica associada à deposição

de lipídios na parede de artérias (placa). Com o tempo, o acúmulo e a progressão das placas ateroscleróticas podem reduzir e/ou obstruir o lúmen vascular, o que pode ocasionar na trombose do respectivo vaso, levar à isquemia de órgãos e tecidos associados, além de promover a formação de coágulos. Os principais distúrbios do coração associados à aterosclerose incluem infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, arritmia, distúrbios das válvulas cardíacas e cardiomiopatia (FEBBRAIO; ROY; LEVIN, 2022).

As DCV possuem fatores de risco que podem ser modificáveis ou não modificáveis. Os fatores de riscos modificáveis demonstraram estar associados à aterosclerose e incluem hiperlipidemia, tabagismo, etilismo, hiperglicemia, obesidade, sedentarismo, má alimentação e uso de contraceptivos orais; os não modificáveis incluem história familiar de DCV, idade, sexo e etnia (SMELTZER & BARE, 2009).

Assim, como a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica, ela apresenta contribuição subjacente nas DCV, o que conduziu pesquisas para determinar se outras doenças inflamatórias poderiam contribuir para as DCV (FEBBRAIO; ROY; LEVIN, 2022). Muitas pesquisas evidenciaram uma associação positiva entre periodontite e DCV (MATTILA et al., 1995; BECK et al., 1996; JOSHIPURA et al., 1996; MORRISON et al., 1999; WU et al., 2000, AGUILERA et al., 2020). No entanto, é necessária uma investigação aprofundada para compreender melhor os mecanismos desta associação.

Atualmente há duas hipóteses principais que demonstram a ligação entre periodontite e DCV. A primeira hipótese sugere que as bactérias periodontais (ou seus subprodutos) provoquem uma disseminação hematogênica, e o aumento do número dessas bactérias na cavidade oral induza uma resposta inflamatória com uma intensa produção de mediadores inflamatórios como as interleucinas (IL-1 e IL-6), fibrinogênio, metaloproteinases de matriz (MMPs), prostaglandina (PGE2), fator de necrose tumoral (TNF) e proteína C-reativa (PCR), e isso provoque o transbordamento desses mediadores inflamatórios dos tecidos periodontais ou que de alguma outra forma, promovam a formação de placa e, conseqüentemente, DCV (HAJISHENGALLIS et al., 2021). Sugere-se também que o epitélio ulcerado das bolsas periodontais permita a passagem das bactérias e seus produtos. (HAJISHENGALLIS et al., 2021). Em uma revisão sistemática com meta-análise realizada por Joshi et al., (2021), com objetivo de determinar a prevalência de micro-

organismos periodontais em ateroma coronário e/ou amostras de coágulos aspirados coletadas de pacientes com infarto do miocárdio com doença periodontal, foi demonstrada a detecção consistente de DNA bacteriano periodontal em ateroma coronário, o que sugere sua disseminação sistêmica a partir de sítios periodontais (JOSHI et al., 2021).

Em revisão sistemática a fim de melhor elucidar os mecanismos que correlacionam patógenos periodontais a aterosclerose, verificou-se que os patógenos periodontais têm o potencial de ser um fator contribuinte para a aterosclerose, mesmo na ausência de uma dieta rica em gordura ou alto estresse de cisalhamento. Os estudos selecionados mostraram que as vias de inflamação, adesão celular, necrose e apoptose, tanto em células humanas quanto em modelos animais, foram ativadas por vários patógenos periodontais. Estas espécies foram: *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *F. nucleatum*, *T. denticola*, *E. corrodens*, *S. anginosus* e *S. sanguinis*, ou seus fatores de virulência, lipopolissacarídeo (LPS), vesículas da membrana externa e gingipains (MARROQUIN & GUAUQUE-OLARTE, 2023).

A segunda hipótese sugere que a inflamação induzida pela periodontite aumenta a inflamação sistêmica e as espécies reativas de oxigênio derivadas da doença periodontal contribuem para o estresse oxidativo sistêmico. Assim, mediadores inflamatórios, incluindo várias interleucinas, quimiocinas, citocinas, imunoglobulinas e células inflamatórias (linfócitos, macrófagos, neutrófilos), contribuem para uma resposta imune destrutiva em áreas na parede do vaso, o que contribui e exacerba a inflamação crônica pré-existente. Como resultado, favorece o desenvolvimento de aterosclerose e DCV (FEBBRAIO; ROY; LEVIN, 2022).

De acordo com o relatório de consenso do workshop EFP/AAP sobre periodontite e doenças cardiovasculares, há evidências de estudos epidemiológicos de que pacientes com periodontite apresentam disfunção endotelial significativa, medida por dilatação mediada por fluxo, rigidez arterial (por exemplo, velocidade da onda de pulso) e uma espessura significativamente maior da camada íntima da carótida e elevação de escores de calcificação arterial (SANZ et al., 2020). Há ainda estudos que demonstram níveis significativamente mais altos de proteína C-reativa (PCR) em pacientes com doença cardiovascular e periodontite em comparação com qualquer uma das condições isoladamente (DEMMER et al., 2013; KOPPOLU et al., 2013; PATIL & DESAI, 2013). Interessantemente, a terapia periodontal foi associada

a uma diminuição significativa nos níveis de PCR, juntamente com melhorias nas medições substitutas da saúde cardiovascular (KOPPOLU et al., 2013).

A disseminação de citocinas pró-inflamatórias, entre elas IL-1, IL-6, TNF α e outras quimiocinas do periodonto gera a produção de proteínas de fase aguda, PCR, fibrinogênio e proteína amiloide A pelo fígado. Durante a bacteremia crônica, o sistema imune adaptativo é ativado. Os anticorpos que são produzidos em resposta a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) de patógenos periodontais podem desencadear uma reação cruzada entre células endoteliais e lipoproteína de baixa densidade (LDL) modificado para aumentar o movimento de lipídios nas células dentro da parede do vaso. Alguns desses anticorpos e citocinas inflamatórias podem promover a resposta Th1, ativando ainda mais os macrófagos dentro do ateroma e propagando a aterogênese (NGUYEN et al., 2015).

Quando estimulados por patógenos periodontais, os neutrófilos periféricos de pacientes com periodontite liberam excesso de IL-1 β , IL-8, IL-6 e TNF- α . Por outro lado, a terapia periodontal tem potencial para reduzir significativamente os níveis séricos de IL-6, amiloide A sérica e alfa 1 antiqumotripsina, bem como de reduzir parcialmente a hiperatividade das citocinas (LING; CHAPPLE; MATTHEWS, 2016).

Estudos pré-clínicos, principalmente com roedores, são amplamente utilizados na literatura para avaliação das complicações sistêmicas associadas à periodontite (KOSE et al., 2017; TOMOFUJI et al., 2011; HERRERA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2021). De acordo com Hajishengallis et al., (2021), assim como na periodontite humana, a periodontite experimental causa aumento dos níveis séricos de proteínas de fase aguda (como PCR e amiloide A sérica) e citocinas inflamatórias (por exemplo, IL-1 β e IL-6). Portanto, é um modelo apropriado para estudar a relação entre periodontite e comorbidades sistêmicas (HAJISHENGALLIS et al., 2021).

O QUADRO 1 abaixo exemplifica alguns trabalhos que avaliaram alterações do tecido cardíaco em modelos animais de periodontite.

QUADRO 1 – Estudos que avaliaram alterações do tecido cardíaco de animais com periodontite induzida.

REFERÊNCIA	OBJETIVO	MODELO ANIMAL	MODELO DE INDUÇÃO PERIODONTAL	ACHADOS
Köse et al., (2017)	Avaliar os efeitos da periodontite sobre os níveis séricos de lipídios, níveis de marcadores inflamatórios e tecidos do músculo cardíaco do ventrículo esquerdo de ratos	Ratos	Ligadura nos primeiros molares.	Aumento significativo nos níveis de proteína C-reativa e interleucina-1b e nenhum aumento estatisticamente significativo no nível do fator de necrose tumoral foi observado no grupo periodontite experimental em comparação com o grupo controle. Além disso, o colesterol total, colesterol de lipoproteína de baixa densidade e os níveis de triglicerídeos foram significativamente maiores no grupo periodontite experimental. Achados histológicos e imunológicos mostraram que o número de fator nuclear kappa B-p65- e b-miosina de cadeia pesada positiva em cardiomiócitos aumentou significativamente nas amostras de tecido ventricular esquerdo de ratos com periodontite.
Tomofuji et al., (2011)	Investigar se a geração de peróxido lipídico na inflamação periodontal poderia induzir lesão tecidual no fígado, coração, rim e cérebro	Ratos	Aplicação tópica de LPS no sulco gengival de ambos os 1º molares superiores.	A administração de lipopolissacarídeo e proteases induziu inflamação periodontal, com aumento dos níveis séricos e gengivais de hexanoil-lisina. O nível de 8-hidroxidesoxiguanosina aumentou 2,27, 2,01, 1,49 e

	usando um modelo de rato			1,40 vezes no DNA mitocondrial do fígado, coração, rim e cérebro de ratos com inflamação periodontal, respectivamente. Os resultados revelam que a produção excessiva de peróxido lipídico após a inflamação periodontal está envolvida no dano oxidativo do DNA do cérebro, coração, fígado e rim.
Herrera et al., (2011)	Avaliar as consequências renais e cardíacas da periodontite induzida por ligadura em ratos normotensos e hipertensos com deficiência de NO (tratados com L-NAME- N ω -nitro L-arginina metil éster)).	Ratos	Primeiro molar inferior direito de cada rato recebeu uma ligadura	Em ratos hipertensos com deficiência de NO, a perda óssea alveolar induzida pela periodontite diminuiu significativamente. Além disso, a elevação da proteína nitrotirosina (um marcador de nitração de proteínas cardíacas) induzida por periodontite foi completamente evitada pelo tratamento com L-NAME. Por outro lado, o tratamento com L-NAME aumentou a produção da atividade da mieloperoxidase tanto no coração quanto nos rins de ratos com periodontite. Nenhuma alteração devido à periodontite foi observada no conteúdo de substâncias reativas de tiobarbitúrico cardíaco ou renal.

Ribeiro et al., (2021)	Avaliar o nível hemodinâmico, variabilidade da frequência cardíaca e variabilidade da pressão arterial associados à inflamação miocárdica e concentrações plasmáticas de óxido nítrico (NO) em ratos Wistar-Kyoto espontaneamente hipertensos com doença periodontal.	Ratos	Ligadura bilateral do 1° molar mandibular.	Os resultados demonstraram que a doença periodontal de curta duração reduziu a pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos, o que pode ser devido aos maiores níveis de NO plasmático. Embora a doença periodontal não afetasse nem a variabilidade da frequência cardíaca nem a variabilidade da pressão arterial, induziu inflamação do miocárdio, que pode determinar a disfunção cardiovascular na doença periodontal de longa duração.
-------------------------------	---	-------	--	---

FONTE: O autor (2023).

3.2 ÓXIDO NÍTRICO

O Óxido Nítrico (NO) é uma molécula inorgânica simples, gasosa e possui baixo período de meia vida. Apresenta um elétron desemparelhado em sua última camada, tornando-a uma molécula iônica altamente reativa que se combina facilmente com o oxigênio e com alguns metais de transição (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002). Trata-se de uma molécula sinalizadora, ou seja, um mensageiro intercelular de disseminação rápida que pode facilmente passar de uma célula para outra através da água e das membranas (BROWN, 2007; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). É encontrado em todas as espécies de vertebrados e está relacionado a uma série de mecanismos reguladores como neurotransmissão e vasodilatação (CINELLI; MILEY; SILVERMAN, et al., 2020; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). A principal origem de produção de NO em células de mamíferos é a via biosintética L-arginina/óxido nítrico, em que ocorre a ação de um conjunto de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) (KRÓL & KEPINSKA, 2020).

Há três isoformas de NOS relatadas na literatura, a primeira síntese clonada, a nNOS (NOS neuronal) ou NOS-1 está presente no tecido nervoso e exerce função na regulação central da pressão sanguínea, no relaxamento do músculo liso e na vasodilatação via nervos periféricos. O segundo clone de NOS, o NOS-2 ou óxido nítrico sintase induzida (iNOS) está presente na musculatura lisa e endotelial, por ser facilmente induzida por citocinas pró-inflamatórias e lipopolissacarídeos bacterianos (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). O principal emprego do NO produzido pela iNOS no metabolismo é eliminar ou suprimir patógenos. Contrariamente às demais isoformas, a iNOS não necessita da elevação da concentração de cálcio intracelular, sendo capaz de ser integralmente ativada em níveis normais de cálcio. A grande maioria das células nucleadas do organismo, em particular os macrófagos, monócitos, astrócitos e micróglias podem expressá-lo (CINELLI; MILEY; SILVERMAN, et al., 2020). Ocasionalmente, a produção tóxica de NO pode ser iniciada pela presença de L-arginina e a indução da enzima por IFN- γ , TNF-, IL-1 e especialmente LPS (GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003). A fonte primária do NO descoberta, foi a última a ser clonada, e é denominada de NOS-3 ou óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Produz NO no endotélio em condições basais (FORSTERMANN et al., 1994). Pode ser detectada no endotélio vascular e também em células do mesângio do corpúsculo renal (GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003).

Por sua ação vasodilatadora, o NO possui importante papel na manutenção do tônus vascular. A redução da biodisponibilidade de NO está associada a disfunção endotelial e conseqüente redução da capacidade vasodilatadora do vaso (EISERICH et al., 2002). Tal redução e conseqüente disfunção endotelial já foi demonstrada em estudo pré-clínicos com modelos de periodontite (BRITO et al., 2013) bem como em estudos clínicos (JOSHIPURA et al., 2004; HIGASHI et al., 2009).

3.3 DOENÇA PERIODONTAL E FUNÇÃO ENDOTELIAL

O endotélio é a camada de revestimento dos vasos sanguíneos, um vasto tecido celular que cobre toda a rede vascular, desde grandes veias e artérias até vasos menores, arteríolas e capilares. O endotélio contribui para a homeostase vascular e tem múltiplas funções endócrinas, autócrinas e parácrinas. Está, portanto,

envolvido na síntese de vasoconstritores e vasodilatadores (TEIXEIRA et al., 2014). A homeostase vascular ocorre pela síntese e liberação de substâncias como a prostaciclina, endotelina, prostaglandina e óxido nítrico pelo endotélio. Essas substâncias agem no tônus vasomotor e evitam a trombose, não permitindo a aderência de leucócitos (ABOU-SALEH et al., 2015).

Na doença periodontal, os periodontopatógenos, principalmente *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ocasionam danos no epitélio da bolsa periodontal e desencadeiam a liberação de endotoxinas e exotoxinas para a corrente sanguínea, produzindo uma resposta inflamatória que configura um quadro de disfunção endotelial (HAJISHENGALLIS et al., 2015). Estudos clínicos (JOSHIPURA et al., 2004; HIGASHI et al., 2009) e pré-clínicos (BRITO et al., 2013; MENDES et al., 2014) já documentaram a presença de disfunção endotelial associada à periodontite, com consequente diminuição na produção de óxido nítrico (HIGASHI et al., 2009; MENDES et al., 2014; FERLAZZO et al., 2021). Porém, parece haver certa divergência na literatura. Em um modelo experimental de periodontite em ratos, Wang e Huang (2019), com o objetivo de investigar a função da via de sinalização do NO na progressão da doença periodontal, verificaram aumento na expressão de iNOS e NO (WANG & HUANG, 2019). Estudos clínicos também demonstraram que pacientes com periodontite apresentaram óxido nítrico estatisticamente significante mais elevado no soro de que indivíduos do grupo controle (MENAKA et al., 2009; REHER et al., 2007).

Quando ativada por um estímulo externo, a síntese de NO pela iNOS decorre por um período longo de tempo nas células inflamatórias do sistema imunológico (WANG & HUANG, 2019). Os grandes indutores da síntese de NO e na expressão de iNOS são as citocinas e produtos bacterianos (MENAKA et al., 2009). Apesar de sua capacidade de eliminar patógenos, um excesso desta molécula pode causar citotoxicidade nos tecidos do indivíduo via estresse oxidativo e nitrosativo, conduzindo à degradação do tecido e lesões no DNA (ANDRUKHOV et al., 2013; MENAKA et al., 2009). Adicionalmente, o impacto da elevação dos parâmetros do estresse oxidativo e alteração da capacidade antioxidante na periodontite são evidenciadas no soro e na saliva (BALTACIOGLU et al., 2014).

O NO apresenta um papel protetor na doença arterial coronariana e nas doenças tromboembólicas (KINGWELL et al., 2000). Desse modo, a disfunção

endotelial que ocorre pela diminuição da formação e/ou biodisponibilidade de NO é um dos fatores que podem colaborar para o desenvolvimento das DCVs (NEVES et al., 2013). A redução da atividade da NOS-3 ou a degradação espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser uma das causas da redução (YUGAR-TOLEDO et al., 2015). A disfunção endotelial está relacionada, ainda, à hipertensão arterial, diabetes mellitus, resistência insulínica e lesões ateroscleróticas decorrentes da vasodilatação deficiente (WAJCHENBERG, 2002).

A produção local exacerbada por iNOS tem um efeito inicialmente protetor, porém tem como consequência danos teciduais ao hospedeiro. O NO e os mediadores inflamatórios desencadeados na atividade inflamatória são capazes de migrar pelo tecido sanguíneo para outros locais, como os órgãos, e influenciar no desenvolvimento ou fisiopatologia de outras doenças (MENAKA et al., 2009; REHER et al., 2007). Interessantemente, a diminuição da biodisponibilidade de NO é capaz de ser contrabalanceada parcialmente pela ativação de vias alternativas que incluem a produção e liberação de prostaciclina derivada da via das ciclooxigenases (COX) (TANG & VANHOUTTE, 2009). O NO pode ativar as ciclooxigenases, entre elas a COX-2, assim como outras enzimas pró-inflamatórias, e também pode contribuir para os danos aos tecidos periodontais (MENAKA et al., 2009).

Em processos inflamatórios sistêmicos é observada uma expressão aumentada da enzima COX-2 com consequente disfunção endotelial, o que sugere possível aspecto protetor vascular da COX-2, por meio da produção de prostanóides vasodilatadores como a prostaciclina (PGI₂) (MORTON & DONGARI-BAGTZOGLOU, 2001; LIPSKY et al., 2000).

A inibição seletiva da COX-2 (com Etoricoxibe ou Celecoxibe) é capaz de controlar e prevenir dor e inflamação em pacientes submetidos a cirurgia periodontal (STEFFENS; SANTOS; PILATTI, 2011), bem como previne a perda óssea decorrente da periodontite em modelos experimentais (AZOUBEL et al., 2005; MENDES et al., 2014). No entanto, questiona-se a segurança do uso de inibidores seletivos da COX-2 durante processos inflamatórios crônicos como a periodontite.

3.4 CICLOOXIGENASES

O ácido araquidônico (AA) é um dos ácidos graxos que compõem a membrana celular. Este ácido graxo deve estar livre da membrana celular para

iniciar a cascata do AA. O processo de liberação do AA depende da ação de enzimas que são capazes de liberar o AA da membrana para o citoplasma. A principal enzima, a fosfolipase A2, é responsável por liberar o AA da membrana celular, que é a etapa geral na limitação do nível de eicosanóides (os eicosanóides são mediadores lipídicos de grande importância na fisiologia e em patologias humanas) (LEHNINGER & NELSON, 2006).

O AA sofre oxidação e é dividido em duas vias: a da ciclooxigenase (COX) também denominada de prostaglandina (PG) G/H sintase citosólica e a da lipooxigenase (LOX). A cascata de ácido araquidônico, representa na FIGURA 1, desempenha várias funções vitais por meio de seus produtos conhecidos como eicosanóides, que são hormônios parácrinos e autócrinos, na homeostasia, termorregulação, hemorreologia e transmissão neural. Sua principal função está em sua ação na via pró-inflamatória, como resultado da síntese de prostaglandinas (SIQUEIRA & DANTAS, 2000).

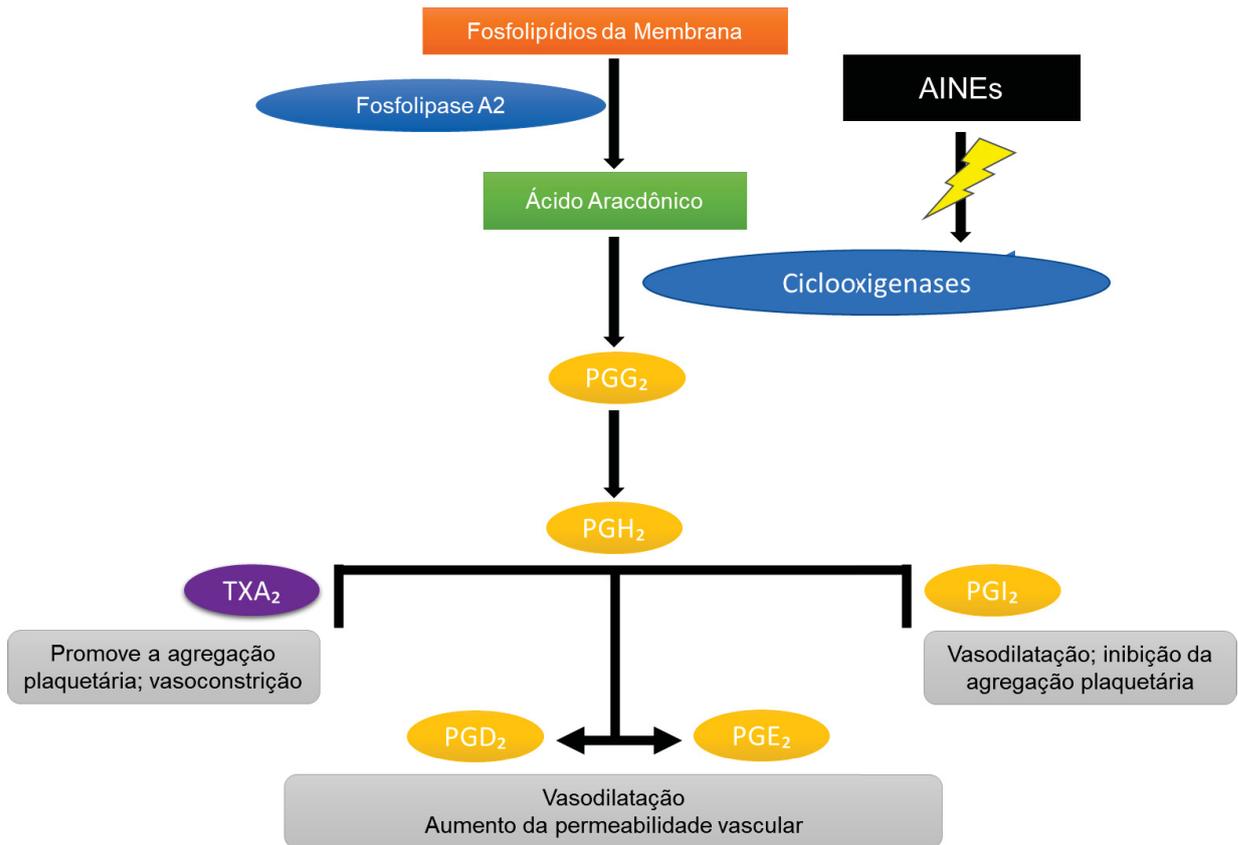
As enzimas COX convertem o ácido araquidônico em prostanóides. Estes prostanóides são prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano. O primeiro membro desta cascata começa com a formação de PGG₂ e depois PGH₂. PGH₂ é convertido em várias isoformas de PG, como PGE₂, PGD₂, PGF₂α, PGI₂ ou TXA₂ por meio de isomerases específicas de tecido. Em outra via, o ácido araquidônico é convertido em leucotrienos por três formas de lipoxigenases. O prostanóide mais abundante no corpo humano é a PGE₂. Dependendo do contexto, a PGE₂ pode exercer um papel homeostático, pró-inflamatório ou anti-inflamatório (PARK; PILLINGER; ABRAMSON, 2006). Na periodontite, o PGE₂ juntamente com IL-1, RANK-L, e TNF- α promovem a ação da atividade osteoclástica, o que contribui para a perda óssea alveolar (HIENZ; PALIWAL; IVANOVSKI, 2019).

Nas células de mamíferos, a COX está presente em diferentes formas: COX-1 (ciclooxigenase-1), COX-2 (ciclooxigenase-2) e COX-3 (ciclooxigenase-3); tais enzimas apresentam padrões de expressão e atividades biológicas distintos. A COX-1 é a constitutiva, sendo relacionada às atividades fisiológicas, apresenta grande importância na regulação de funções fisiológicas do organismo, tendo seu nível estável independente da ocorrência de processos inflamatórios. A COX-2 apresenta uma expressão basal constitutiva, porém é induzida por certos estímulos; assim, também é chamada de isoforma induzível da enzima COX. Apresenta grande importância em processos inflamatórios, situações em que a COX-2 é super-

expressa. A COX-3 está ligada à síntese da lipoxina que possui efeito anti-inflamatório e está presente no sistema nervoso central, sua atividade enzimática ainda não foi completamente elucidada (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2007; SANDOVAL, 2017).

Apesar de a COX-2 estar aumentada em processos inflamatórios, esta enzima não tem somente papel na resposta inflamatória, mas também participa na fisiologia de muitos tecidos e órgãos, como por exemplo rins, pâncreas, cérebro, atividade dos osteoblastos e osteoclastos, regulação da função endotelial e plaquetária (GALLI & PANZETTA, 2007). Logo, a inibição das ciclooxigenases apresenta efeitos adversos já bem documentados na literatura (MENDES et al., 2012; FITZGERALD, 2004). Vale salientar que os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) são os medicamentos mais prescritos em todo o mundo. Estima-se que 30 milhões de pessoas por dia em todo o mundo realizem a utilização de AINES. Essas drogas são utilizadas por seus efeitos de analgesia, anti-inflamatório e antipirético (SINGH et al., 1996; JONES, 2001; BATLOUNI, 2010).

A conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas é impedida pelos AINES, pois inibem a atividade da enzima COX, sendo assim não ocorre a vasodilatação, conseqüentemente dor, febre e edema. Esta inibição pode ser de forma não específica, cujo efeito de inibição é na COX-1 e na COX-2, ou seletiva, quando a inibição tem maior afinidade pela COX-2 (BATLOUNI, 2010).



FONTE: Imagem adaptada de Semeraro et al., (2015).

FIGURA 1 – Cascata do ácido araquidônico na inflamação. AINEs: anti-inflamatórios não esteróides; PGG2: Prostaglandina G2; PGH2: Prostaglandina H2; TXA2: Tromboxano A2; PGD2: Prostaglandina D2; PGE2: Prostaglandina E2; PGI2: Prostaciclina.

3.5 INIBIÇÃO SELETIVA DA COX-2

A partir da década de 90, foram desenvolvidos os inibidores seletivos não esteroidais, chamados COXIBEs, inibidores seletivos da COX-2 (EMERY, 1996). Com a intuito de minimizar os efeitos colaterais deletérios do AINEs não seletivos, principalmente os gastrointestinais (BATLOUNI, 2010).

Os primeiros inibidores seletivos da COX-2, celecoxibe e rofecoxibe, entraram no mercado cerca de uma década após a descoberta do COX-2. Em consequência a uma intensa campanha de marketing em 2001, as vendas do rofecoxibe chegaram a US\$ 2,5 bilhões no mercado de 80 países (MENDES et al., 2012). Na sequência, uma segunda geração de inibidores foi lançada no mercado, que incluiu Valdecoxib, Etoricoxibe, Parecoxib e Lumiracoxib (ORLYVARDENY; SCOTT, SOLOMON, 2008).

Apesar de sua popularidade, algum tempo após foi verificado em estudos que os COXIBs poderiam apresentar efeitos indesejáveis. Alguns dos primeiros estudos foram *Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research* (VIGOR) (BOMBARDIER et al., 2000), que comparou rofecoxib com naproxeno, e o estudo *Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study* (CLASS) (SILVERSTEIN et al., 2000), que comparou celecoxib com ibuprofeno e diclofenaco. Tais estudos levantaram as primeiras dúvidas a respeito dos riscos cardiovasculares dos anti-inflamatórios não esteróides inibidores seletivos da ciclo-oxigenase-2 (COXIBEs). O estudo VIGOR (BOMBARDIER et al., 2000) mostrou uma ligação entre os AINEs específicos para PGHS-2 e o risco de DCV. Os eventos cardiovasculares incluídos foram: Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), angina instável, morte cardíaca súbita, eventos cerebrovasculares e vasculares periféricos. Acredite-se que o rofecoxibe seja responsável por quase 28 mil infartos do miocárdio e mortes súbitas nos Estados Unidos entre 1999 e 2003 (MENDES et al., 2012; BATLOUNI, 2010). Rofecoxib foi voluntariamente retirado do mercado no final de 2004 devido à interrupção do estudo *Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx* (APPROV), cujos resultados mostraram sua ligação com um aumento de eventos trombóticos que poderiam resultar em acidente vascular cerebral e IAM (VAITHIANATHAN et al., 2009).

Os resultados de uma revisão de segurança da utilização de COXIBEs, publicada pela European Medicines Agency – EMA, concluíram que o aumento do risco cardiovascular dos COXIBEs é uma particularidade desta classe, estando relacionado, porém, a dose e tempo de utilização, devendo o prescritor atentar-se a isso assim como a fatores de risco individuais do paciente (EMA, 2006).

No Brasil, apenas Celecoxibe e Etoricoxibe estão disponíveis comercialmente, ambos com receita controlada e com clara indicação dos riscos cardiovasculares (MENDES et al., 2012).

3.6 EFEITOS CARDIOVASCULARES DA INIBIÇÃO SELETIVA DA COX-2

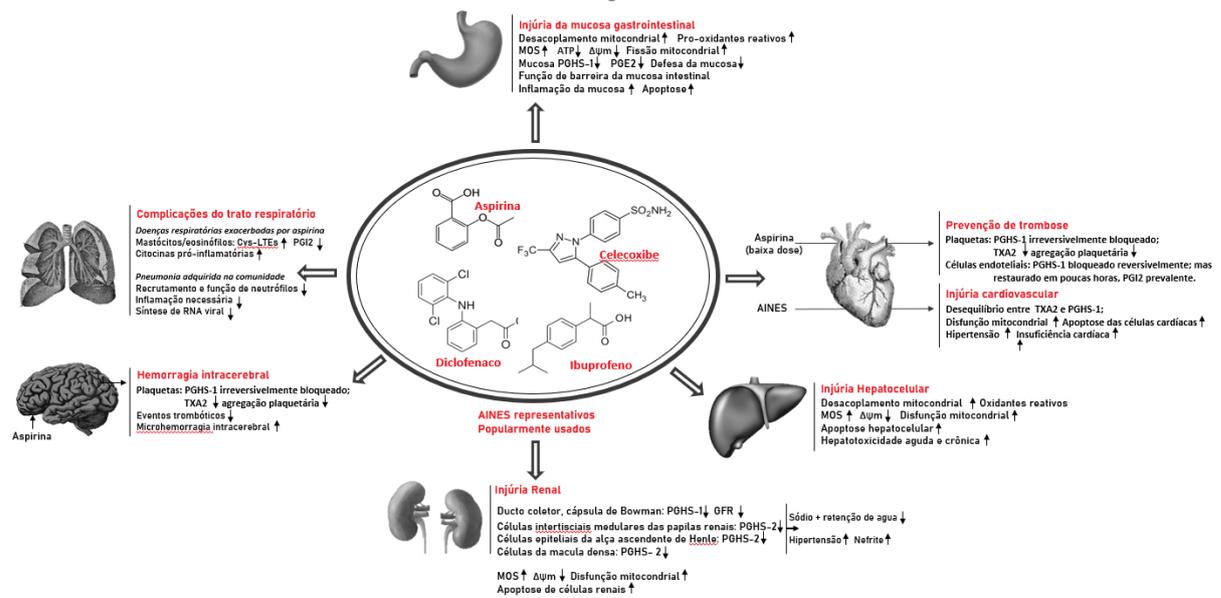
Inicialmente desenvolvida para reduzir os efeitos gastrointestinais indesejáveis dos AINEs não seletivos, a inibição seletiva da COX-2 pode causar uma variedade de efeitos adversos, tanto no sistema cardiovascular como no renal (FIGURA 2), entre outros de menor significado clínico (BATLOUNI, 2010). Os inibidores seletivos da COX-2 têm o potencial de causar vasoconstrição em artérias,

uma vez que uma importante ação da COX-2 é a vasodilatação; logo, a inibição desta enzima representa risco para pacientes com problemas cardiovasculares (BATLOUNI, 2010).

Os inibidores de COX-2 podem afetar o equilíbrio entre TXA₂ e PGI₂, o que resulta em aumento de eventos hemorrágicos e cardiovasculares por diminuir a produção de PG vascular. Há diferenças entre os COXIBEs e o risco cardiovascular. Os riscos não se relacionam apenas a eventos trombóticos, mas também à retenção de sódio e água, aumento da pressão arterial e desenvolvimento de insuficiência cardíaca como resultado de alterações na formação de PGs que modificam as trocas de sódio e água nos rins no nível tubular (CHAHADE; GIORGI; SZAJUBOK, 2008).

Sugere-se que a presença da COX-2 constitutivamente expressa nos rins ou no endotélio vascular sistêmico seja atribuída ao efeito cardioprotetor da COX-2. Visando a comunicação interorgânica, é bem conhecido que a resposta de um órgão às mudanças circundantes pode influenciar ou regular o funcionamento de outros órgãos. Desta forma, uma ligação rim-coração foi proposta. A inibição renal de COX-2 com AINEs pode aumentar a dimetilarginina assimétrica, um inibidor endógeno da eNOS, que ao bloquear a eNOS minimiza o efeito protetor do NO e, assim, aumenta a pressão arterial, aterosclerose e trombose (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020). A inibição de COX-2 também pode levar ao acúmulo de AA que, por sua vez, aumenta a disfunção mitocondrial cardíaca (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020). A correlação positiva entre o aumento dos incidentes de DCV e o aumento do poder inibitório do COX-2 já foi bem documentada (GARCIA-RODRIGUEZ; TACCONELLI; PATRIGNANI, 2008).

Tendo em vista os estudos já realizados, em animais, clínicos e observacionais, foi proposto que propensão à trombose, pelo desequilíbrio pró-trombótico/antitrombótico na superfície endotelial, além da perda do efeito protetor da regulação superior da COX-2 na isquemia miocárdica e no infarto do miocárdio sejam as consequências mais importantes da inibição seletiva da COX-2 (BATLOUNI, 2010).



FONTE: Traduzido e adaptado de BINDU, et al. (2020).

FIGURA 2 – Representação esquemática dos efeitos dos AINEs em diferentes órgãos-alvo. As setas para cima indicam regulação/elevação; as setas para baixo indicam diminuição/depleção. PG-prostaglandina. TX- Tromboxano, MOS)- estresse oxidativo mitocondrial, $\Delta\Psi_m$ - despolarização do potencial transmembrana mitocondrial.

Estudos *in vitro* mostram que cardiomiócitos tratados com AINEs apresentam alterações no padrão de expressão gênica nas principais vias celulares, como apoptótica, transdução de sinal e transcrição (OH et al., 2018). Alguns autores atribuíram os efeitos de alguns AINEs tóxicos a um aumento na suscetibilidade das membranas dos cardiomiócitos ao dano oxidativo ou ao aumento de metabólitos tóxicos do ácido araquidônico (MASON et al., 2006; LIU et al., 2010).

4 JUSTIFICATIVA

Diante do exposto, é bem estabelecida a contraindicação da inibição seletiva da COX-2 em pacientes com histórico ou com risco aumentado para complicações cardiovasculares. No entanto, o uso desses fármacos em pacientes com demais doenças inflamatórias sistêmicas – que não cardiovasculares – ainda necessita de mais investigação.

Assim, propõe-se com este estudo verificar se animais com periodontite que receberam inibidor seletivo da COX-2 apresentam maior dano ao tecido cardíaco quando submetidos a lesão de isquemia cardíaca. Os dados obtidos podem fornecer

melhores evidências quanto à segurança do uso desses fármacos em pacientes com doenças inflamatórias crônicas bem como podem orientar estudos futuros.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 AMOSTRA

Foram utilizados 75 ratos Wistar machos de 2 meses de idade, com peso médio de 250 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo de claro/escuro (12/12h) controlados automaticamente. Os animais tiveram livre acesso à alimentação e água. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. (CEUA, Processo 23075.082142/2019-27, Aprovação nº 1329- ANEXO 1) Todos os procedimentos seguiram as diretrizes do *The Animal Research: Reporting in Vivo Experiments* (ARRIVE). Os animais foram aleatoriamente divididos em dois protocolos experimentais: Protocolo 1 e Protocolo 2, que estão descritos a seguir.

5.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

O estudo foi dividido em dois protocolos.

O protocolo 1 teve a finalidade de caracterizar o modelo de periodontite e comparar as alterações locais, sorológicas e no tecido cardíaco em diferentes tempos experimentais, como mostra a FIGURA 3 abaixo:

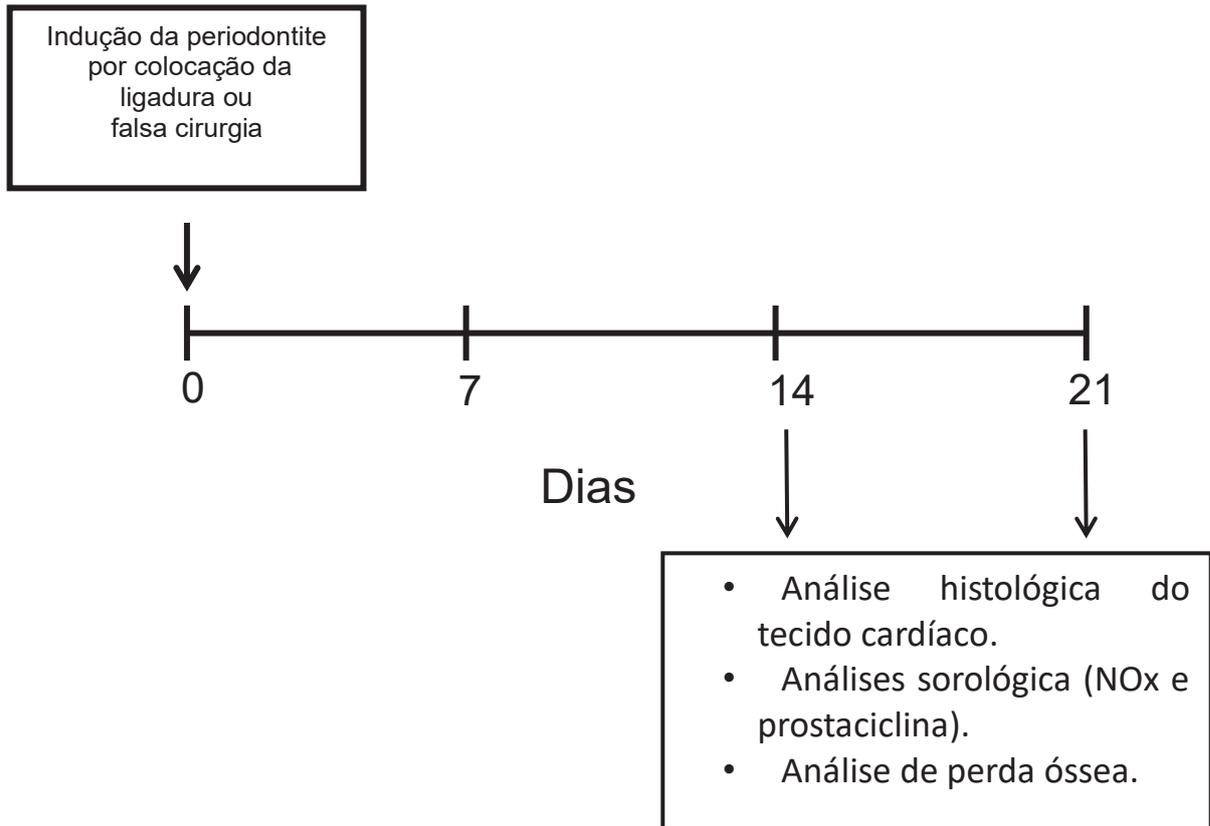


FIGURA 3 – Esquema representativo do protocolo 1 experimental.

Foram utilizados 18 animais divididos randomicamente em dois grupos: controle (sham/falso-operado; n=5); periodontite experimental 14 dias (n=7); periodontite experimental 21 dias (n=6). Todos os animais foram submetidos ao procedimento de colocação da ligadura ou falso-operados (as ligaduras foram removidas imediatamente após sua colocação). Quatorze e 21 dias após o procedimento, os ratos foram eutanasiados e os corações foram removidos para análises histológica e imunohistoquímica. A mandíbula e maxila foram removidas para caracterização da periodontite (análise morfométrica).

Uma vez estabelecidos os tempos experimentais para alterações no tecido cardíaco decorrentes da periodontite, delineou-se o protocolo 2, descrito a seguir.

Foram utilizados 57 animais divididos randomicamente em cinco grupos:

- Grupo Naive (não submetidos a nenhum procedimento; n=4);
- Grupo sham/falso-operado + veículo (os animais passaram pela falsa cirurgia – ligaduras posicionadas e imediatamente removidas, e receberam água destilada, 1 mL/kg/dia, v.o; n=11);
- Grupo sham/falso-operado + etoricoxibe (os animais receberam ligaduras

nos primeiros molares inferiores e segundos molares superiores e foram tratados com etoricoxibe, 10 mg/kg/dia, v.o; n=15);

d) Grupo ligadura + veículo (os animais receberam ligadura e foram tratados com água, 1 mL/kg/dia, v.o, n=13) ;

e) Grupo ligadura + etoricoxibe (os animais receberam ligadura e foram tratados com etoricoxibe, 10 mg/kg/dia, v.o , n=14)

Após os procedimentos, os animais foram randomicamente separados em dois grupos para eutanásia nos dias 21 ou 27, conforme FIGURA 4 abaixo:

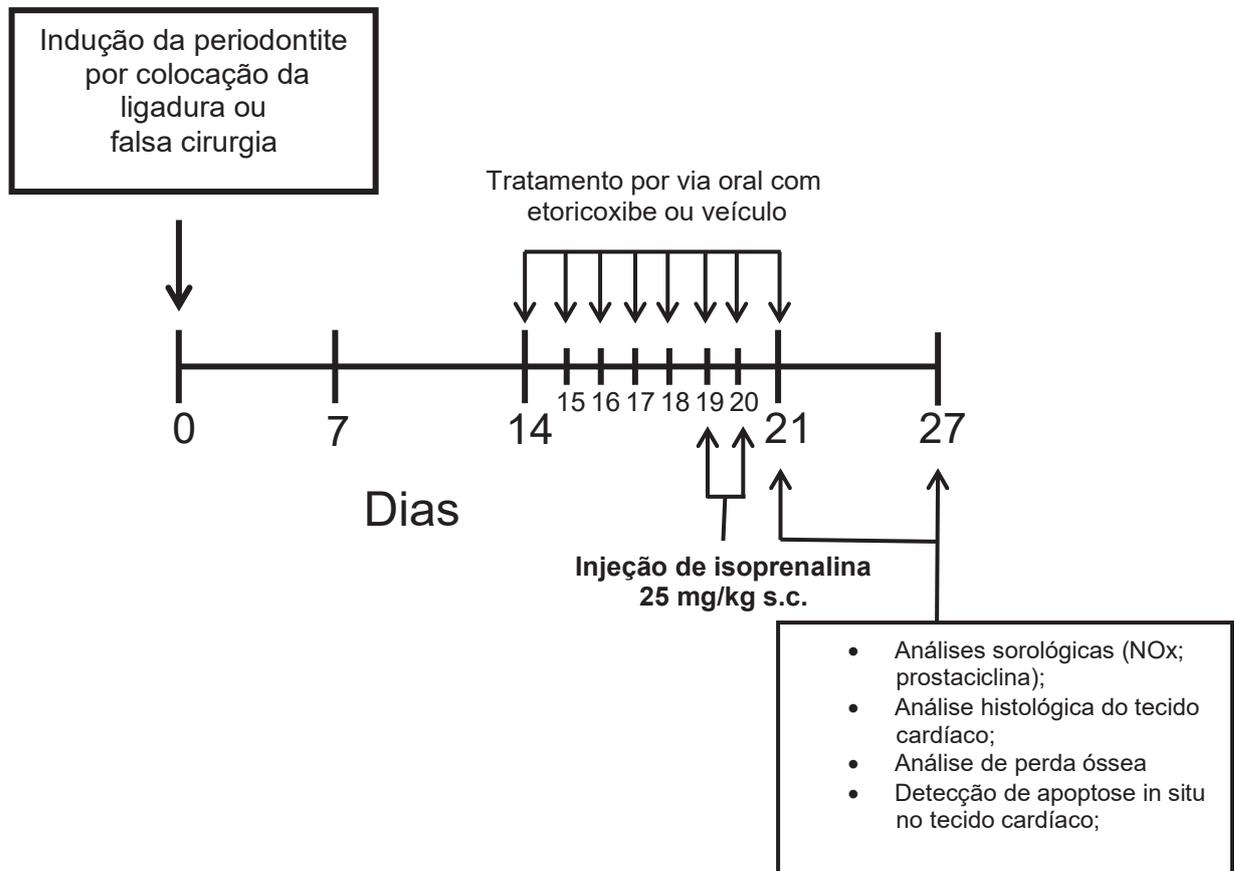


FIGURA 4: Esquema representativo do protocolo 2 experimental.

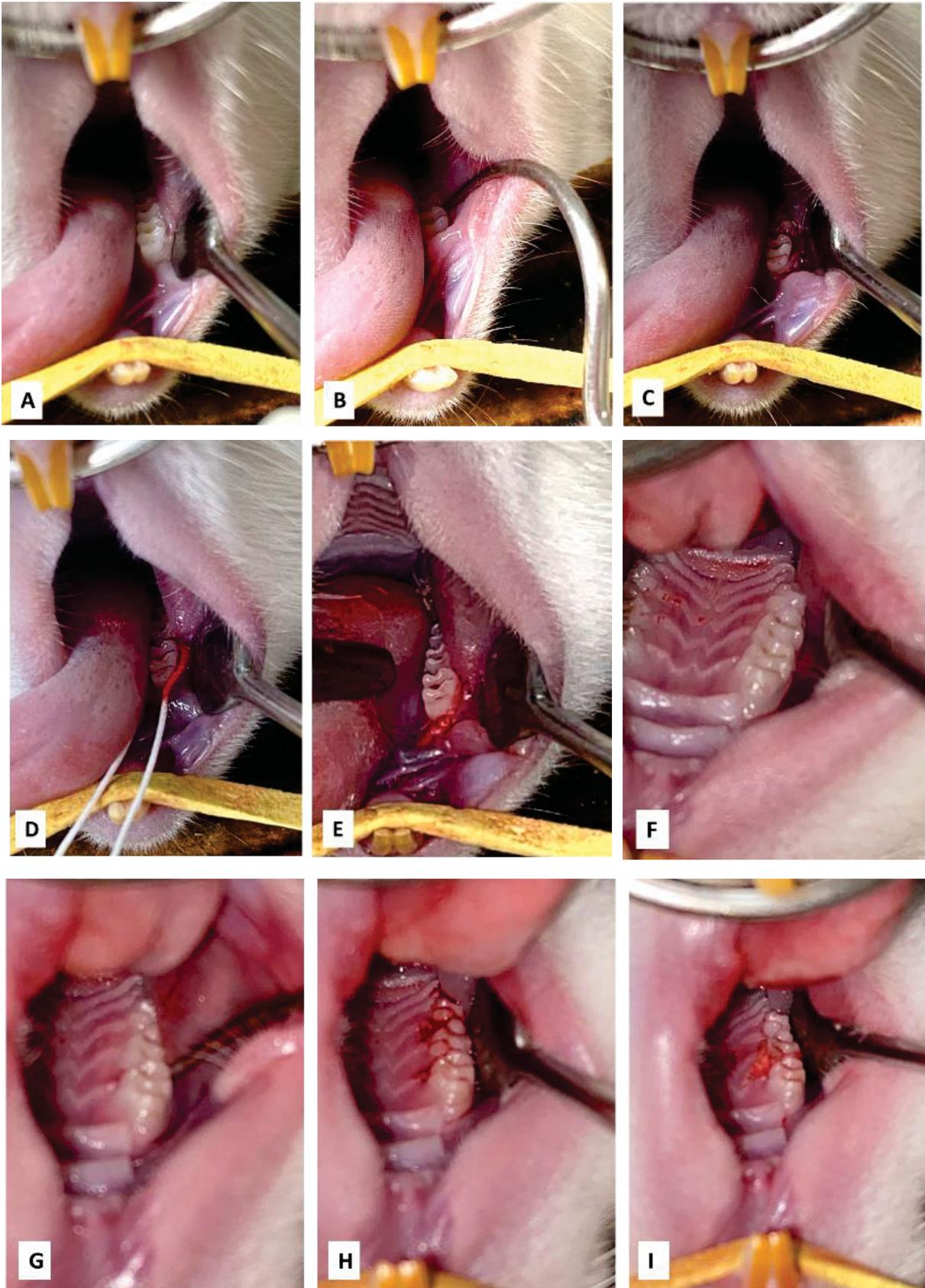
Todos os animais foram submetidos ao procedimento de colocação da ligadura ou falso-operados (as ligaduras foram removidas imediatamente após sua colocação). Nos dias 19 e 20 todos animais receberam isoprenalina (25 mg/kg, s.c.) para indução de lesão de isquemia cardíaca, com exceção do grupo Naive. Nos dias 21 ou 27 os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica. Sangue foi coletado para análise de biomarcadores. Os corações foram retirados para análise

histológica e imunohistoquímica. A mandíbula e a maxila foram dissecadas para análise da perda óssea alveolar induzida pela periodontite.

5.3 INDUÇÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL

A indução da periodontite foi feita após a anestesia com 20 ui quetamina 75 mg/kg e 20 ui xilasina 15 mg/kg por via intraperitoneal. Após anestesiados, os animais foram posicionados no aparato de Doku.

O material utilizado para a ligadura foi fio de algodão (Fio 10 Pipa Tex 85 131 jardas). Os dentes foram levemente luxados com auxílio de uma sonda exploradora a fim de criar espaço para as ligaduras. Os primeiros molares inferiores e segundos molares superiores direito e esquerdo foram ligados, conforme a FIGURA 5, tomando cuidado para que o fio penetrasse no sulco gengival, portanto em íntima proximidade aos tecidos gengivais, ficando o nó na região mesial no inferior e lingual no superior (JAGADISH et al., 2014; ABE & HAJISHENGALLIS, 2013). Os animais falso-operados foram submetidos ao mesmo procedimento, entretanto as ligaduras foram removidas após sua colocação.



FONTE: O autor (2023).

FIGURA 5 – Colocação das ligaduras nos ratos. A e F: Fotos iniciais, A: 1º molar direito inferior e F 2º molar superior esquerdo; B e G :Dentes sendo luxados com auxílio de uma sonda exploradora para

criar espaço para colocação da ligadura. C e H: aspecto dental após a luxação dental; D: colocação do fio ao redor do dente; I e E: Ligaduras finalizadas.

5.4 INDUÇÃO DE ISQUEMIA CARDÍACA

As lesões miocárdicas foram induzidas nos animais por meio da administração de isoproterenol (25 mg/kg, s.c.) por dois dias consecutivos, de acordo com o modelo previamente estabelecido por Rona et al., (1959). Nessa faixa de dose, o isoproterenol promove uma queda sustentada na pressão arterial média concomitante com um aumento na frequência cardíaca. A diferença entre a demanda e a oferta de oxigênio promove uma lesão miocárdica isquêmica com características semelhantes ao infarto do miocárdio.

5.5 ADMINISTRAÇÃO DA MEDICAÇÃO

Foi administrado etoricoxibe 90 mg (Arcoxia®). O comprimido foi pesado, triturado manualmente e diluído em água na concentração de 10 mg/kg. A medicação foi administrada por meio de gavagem oral (FIGURA 6), diariamente do décimo quarto ao vigésimo primeiro dia do protocolo experimental. Os animais do grupo veículo receberam água destilada por meio de gavagem oral.



FONTE: O autor (2023).

FIGURA 6 – Administração da medicação ou placebo por meio de gavagem oral.

5.6 COLETA DE AMOSTRAS

Os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica de quetamina 75 mg/kg e xilazina 15 mg/kg por via intraperitoneal. Amostras de sangue foram coletadas (*in vivo*) através de punção venosa, foram centrifugadas com 1500 g por 10 minutos em centrífuga refrigerada. Imediatamente após a centrifugação, com auxílio de uma micropipeta, o plasma foi coletado e armazenado em freezer -80°C. Os corações foram coletados e fixados em solução paraformaldeído. As mandíbulas e maxilas foram dissecadas e congeladas e posteriormente processadas.

5.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os corações foram fixados em solução de paraformaldeído. Posteriormente foi realizado um corte longitudinal com lâmina de bisturi na região de ventrículo esquerdo, e as amostras foram desidratadas e emblocadas em parafina. (FIGURA 7)



FONTE: O autor (2023).

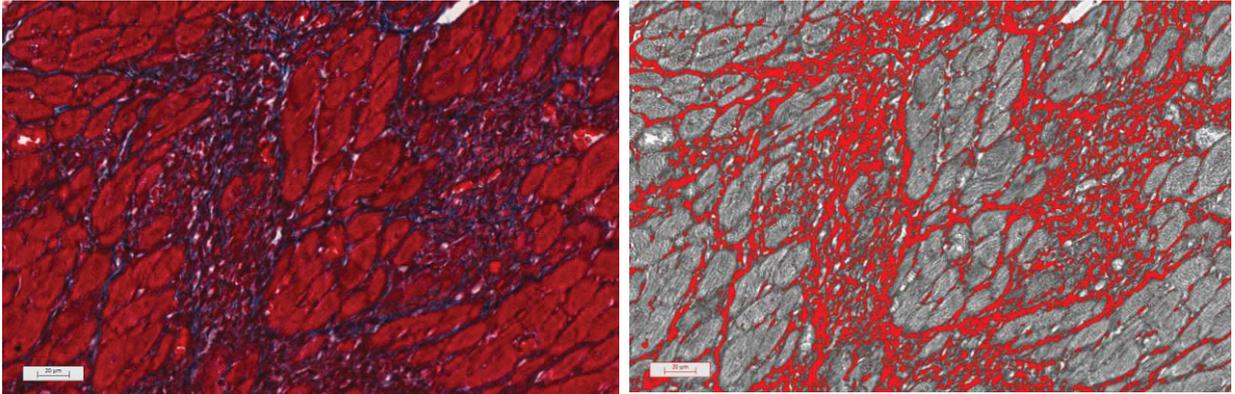
FIGURA 7 – Foto do coração fixado em paraformaldeído de um animal submetido a indução de isquemia cardíaca

Os blocos foram seccionados em cortes de 5 μ m e esticados em lâminas. Os cortes hidratados em xilol, seguiram por sequência decrescente de álcool, finalizando com coloração em Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômio de Mallory. Para analisar alterações presentes no tecido cardíaco, as lâminas foram avaliadas por um mesmo pesquisador previamente treinado e calibrado.

Para análise do Infiltrado inflamatório, as lâminas foram coradas com HE e analisadas de formas descritiva e qualitativa. Para análise qualitativa os cortes foram avaliados ao microscópio óptico, em aumento de $\times 20$ e as lâminas receberam escores quanto à presença do infiltrado inflamatório. Recebendo escores (0,1,2, 3 e 4) quanto à presença do infiltrado inflamatório. Sendo 0- ausente, 1- pouco presente, 2- moderadamente presente, 3-muito presente, 4 - excessivamente presente, semelhante a metodologia de Mendes, (2012). Na análise descritiva as lâminas foram digitalizadas por meio de Scanner de lâminas Zeiss/MetaSystems, disponibilizado pelo Centro de Tecnologias Avançadas de Fluorescência da Universidade Federal do Paraná e analisadas de forma gradativa, com conjunto para aumentos de $\times 10$, $\times 20$ e $\times 40$. Para cada animal, foram analisadas aproximadamente três lâminas histológicas através do programa de obtenção das imagens VSViewer versão 2.1.102 da MetaSystems®. Foram avaliados descritivamente em diferentes eventos microscópicos, tais como:

- Características do Infiltrado inflamatório;
- Presença lesão celular (edema, cariólise, fragmentação dos cardiomiócitos, necrose, posição nuclear);
- Presença de fibroblastos.

A coloração Tricômico de Mallory foi utilizada para verificar a presença de fibras colágenas, as lâminas foram digitalizadas por meio de Scanner de lâminas Zeiss/MetaSystems, disponibilizado pelo Centro de Tecnologias Avançadas de Fluorescência da Universidade Federal do Paraná. Foi utilizado o programa Image J para calcular a fração do volume de colágeno (FVC) realizada sob magnificação 200x (FIGURA 8). Cada lâmina teve 6 regiões sem vasos coronários e 6 com vasos analisadas. FVC foi calculado como a porcentagem de fibras colágenas. FVC-T foi definido como a porcentagem total de colágeno, conforme descrito em Wu et al., (2021).



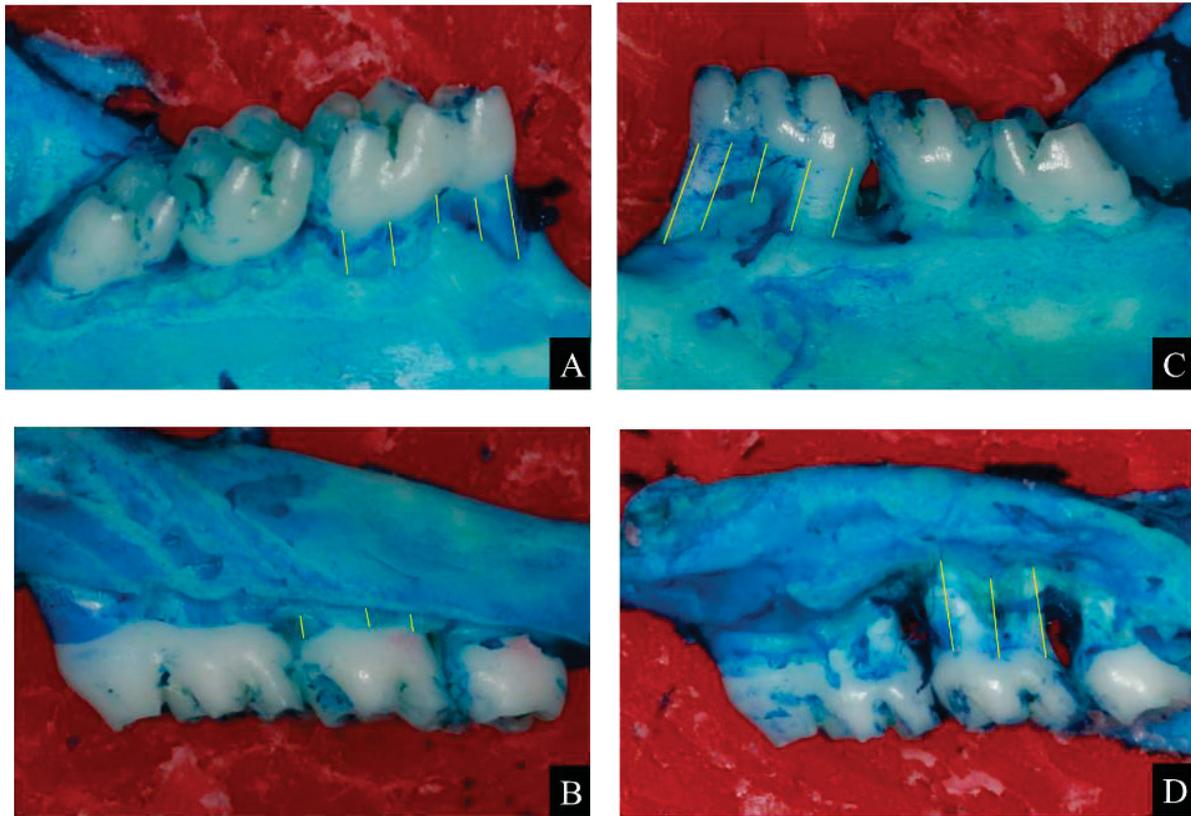
FONTE: O autor (2023).

FIGURA 8 – Demonstração da utilização do programa Image J para obtenção FVC.

Todas as análises histopatológicas foram feitas com auxílio de um patologista com experiente.

5.8 AVALIAÇÃO DA PERDA ÓSSEA: ANÁLISE MORFOMÉTRICA

As mandíbulas e maxilas dissecadas e coletadas foram submetidas à fervura em água por 30 minutos, na sequência foram imersas em peróxido de hidrogênio 10v ou 3% por 12 horas. Após as amostras estarem bem secas, elas foram imersas e imediatamente removidas de solução de azul de metileno (1 g/100 mL), para evidenciar a junção cimento-esmalte. As amostras foram fotografadas de forma padrão em uma Câmera profissional (SLRCANON EOS 7D Mark II / LENTE EF 100 mm f/2.8L Macro) e armazenadas. As imagens foram analisadas no programa Image-J pelo mesmo examinador previamente treinado e calibrado. Foram consideradas cinco medidas lineares para cada face dos dentes inferiores e três medidas lineares (mm) para cada face dos dentes superiores, representadas na FIGURA 9.



FONTE: O autor (2023).

FIGURA 9 – Maxilares preparados para avaliação da perda óssea do protocolo 1. Mandíbula e maxila dos animais do grupo Sham respectivamente (A e B). Mandíbula e maxila dos animais do grupo ligadura respectivamente (C e D).

5.9 DETECÇÃO DA APOPTOSE IN SITU

O Kit de Detecção de Apoptose In Situ CardioTACS™ (4827-30-K) R&D Systems®, Inc foi usado para detectar células apoptóticas dos animais do protocolo 2. Conforme descrito anteriormente, os corações foram fixados em paraformaldeído. Foram utilizadas lâminas silanizadas com carga positiva (ImunoSlide – EasyPathIDiagnósticos®), os cortes foram seccionados em 3 μm . Foram utilizados 2 cortes em cada lâmina. Realizada a desparafinização e rehidratação com Xilol e álcool graduais, respectivamente. Os cortes foram então lavados em 1x PBS por duas vezes, cada lavagem de 5 minutos, em seguida foram colocadas 1XPBS novamente por 10 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram então cobertos com 50 μl de Proteinase K Solution e incubados por 19 minutos em

temperatura ambiente, seguidos de lavagem por 2 vezes em água destilada, 2 minutos cada lavagem. As seções foram então imersas em Quenching Solution por 5 minutos à temperatura ambiente, seguidas de lavagem por dois tempos de lavagem de 1 minuto à temperatura ambiente em água destilada, a fim de remover a solução anterior. As seções foram então imersas em 1X TdT Labeling Buffer por 5 minutos. As seções foram então cobertas com 50 µl de Labeling Reaction Mix e incubadas a 37°C em câmara úmida por uma hora. As seções foram então imersas em 1X TdT Stop Buffer por 5 minutos em temperatura ambiente para interromper a reação de rotulagem. Os cortes foram então lavados 2 vezes em água destilada por 5 minutos cada à temperatura ambiente. As seções foram então cobertas com 50 µl de solução de Strep-HRP e incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos. Os cortes foram então lavados por 3 vezes em água destilada por 5 minutos cada lavagem. As seções foram então cobertas com 50 µl de TACS TM Blue Label por 5 minutos. Foram novamente lavados em água destilada em várias trocas por 2 minutos. Os cortes foram então imersos por 5 minutos em Nuclear Fast Red seguido de lavagem em água destilada mergulhada sequencialmente por 10 vezes. Os cortes foram então secos ao ar e desidratados com imersão dez vezes em etanol 95% e clareados com duas trocas de xilol e montados com um meio de montagem e deixadas planas durante a noite para permitir que o meio de montagem endureça. Para células apoptóticas marcadas pelo procedimento de túnel in situ cardioTACS, as células foram consideradas positivas quando havia um padrão de coloração nuclear. As lâminas foram analisadas de forma qualitativa por meio de microscópio óptico e receberam escores (0, 1, 2, 3 e 4) em relação a presença de células apoptóticas. Sendo 0- ausente, 1- pouco presente, 2-moderadamente presente, 3- muito presente, 4- excessivamente presente. Posteriormente as lâminas foram digitalizadas por meio de Scanner de lâminas Zeiss/MetaSystems, disponibilizado pelo Centro de Tecnologias Avançadas de Fluorescência da Universidade Federal do Paraná para análise quantitativa. Nesta análise, 5 campos de alta potência (HPF) foram selecionados aleatoriamente em ampliação de 400x, através do programa de obtenção das imagens VSViewer versão 2.1.102 da MetaSystems®. O programa Image J foi utilizado para análise quantitativa, com auxílio função grade, o número de núcleos cardíacos positivos para TUNEL foi contado através da ferramenta contador de células, em cinco áreas de 1300µm² selecionados aleatoriamente para cada animal, sendo selecionados aleatoriamente dois animais por grupo, os valores

foram calculados e expressos em média de células por campo, semelhante a metodologia utilizada por Niu et al., (2006) e Al-Salam et al., (2020).

5.10 ANÁLISE DA PRESENÇA DE ÓXIDO NÍTRICO

A metodologia utilizada para a quantificação dos valores de NO_x já foi descrita detalhadamente (GRANGER et al., 1990). Basicamente, para a conversão do nitrato para nitrito, as amostras foram incubadas a 37°C durante 2 horas, em presença do nitrato redutase expressa em *Escherichia coli* cultivada em anaerobiose. Após o período de incubação, as amostras passaram por centrifugação para a remoção da bactéria, sendo 100 µL do sobrenadante misturados com o mesmo volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de alfa-naftil-etilenodiamina em água bidestilada) em placas de 96 poços. Finalmente, por meio de regressão linear, os valores foram expressos como µM de NO_x (nitrato e nitrito). As absorbâncias das amostras foram determinadas à 540 nm. Curvas-padrão de nitrato e nitrito (nas concentrações de 0 a 150 µM) foram realizadas simultaneamente com as amostras. Por meio de regressão linear, os valores foram expressos em µM de nitrito/nitrato (NO_x). Valores negativos foram considerados como zero.

5.11 DOSAGEM DE PROSTACICLINA

O plasma coletado e armazenado em freezer -80°C foi utilizado para determinação da quantidade de prostaciclina produzida, as amostras foram avaliadas em duplicata, por um Kit ELISA 6- keto Prostaglandina F 1 α (Cayman Chemical, ref: 515211) seguindo as instruções do fabricante. A prostaciclina - prostaglandina I₂ (PGI₂) - é formada a partir do ácido araquidônico principalmente pelo endotélio vascular e córtex renal. É um potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária. O PGI₂ é hidratado não enzimaticamente em 6-ceto PGF₁ α (t_{1/2} = 2-3 minutos) e depois convertido rapidamente no principal metabólito, 2,3-dinor-6-ceto PGF₁ α (t_{1/2} = 30 minutos). Foram selecionadas de forma aleatória 5 a 8 amostras dos animais do protocolo 1 e protocolo 2. Resumidamente, os padrões ou as amostras foram incubados com o anticorpo marcador, os poços foram então lavados para remover todos os reagentes não ligados e em seguida foi adicionado o

reagente de Ellman. O comprimento de onda de leitura da placa utilizado foi entre 405 e 420 nm. A produção de prostaciclina foi expressa em ng/L de proteína.

5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico GraphPad Prism versão 8. Os valores estão expressos como média \pm SD.

Os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Dados paramétricos foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias seguida por pós teste de Tukey ou Bonferroni, conforme indicado nas legendas. Dados não paramétricos foram analisados por teste de Kruskal-Wallis, seguido por comparação múltipla de Dunn.

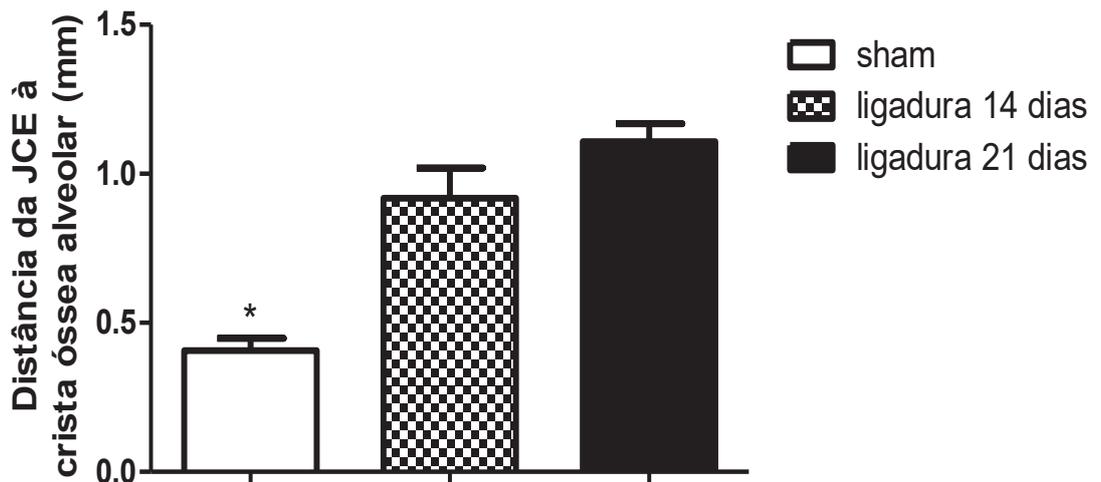
Um valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado significativo.

6 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS PROTOCOLO 1

6.1.1 Perda óssea alveolar média em um modelo experimental de periodontite

Os animais do protocolo 1 foram eutanasiados de acordo com seu tempo experimental (14 ou 21 dias). Este protocolo teve o objetivo caracterizar a periodontite em diferentes tempos experimentais. O GRÁFICO 1 apresenta a perda óssea alveolar média avaliada através da análise morfométrica. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Sham e os grupos ligadura, caracterizando periodontite. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ligadura 14 e 21 dias.

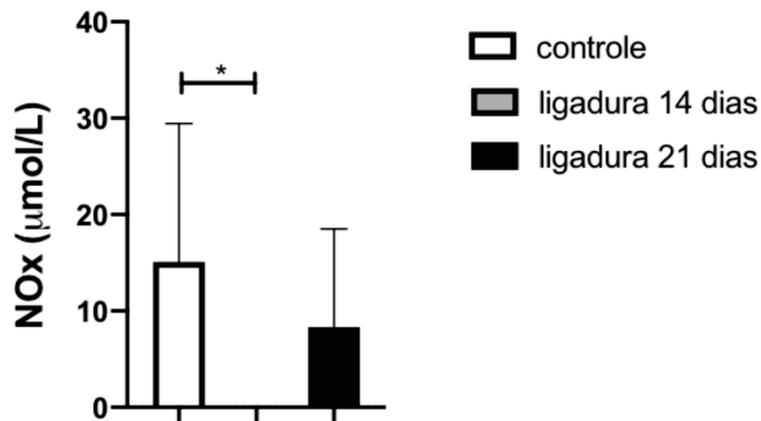


FONTE: O autor (2023).

GRÁFICO 1: Análise morfométrica da perda óssea alveolar. Imagem representativa da distância da junção cimento esmalte à crista óssea alveolar (mm) do segundo molar superior direito dos animais. Os dados estão expressos em média \pm SD e foram analisados por ANOVA de uma via seguida por pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$

6.1.2 Quantificação de nitrito e nitrato (NOx) em um modelo experimental de periodontite

Nos animais do Protocolo 1, observa-se que houve redução na biodisponibilidade de NOx aos 14 dias. Esta redução foi restaurada aos 21 dias (GRÁFICO 2).



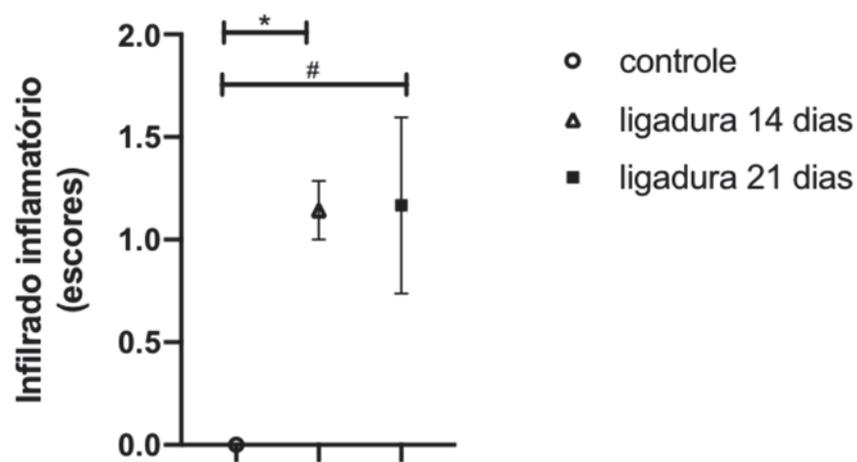
FONTE: O autor (2023).

GRÁFICO 2: Dados expressos em média \pm DP dos valores de NOx ($\mu\text{mol/L}$) do protocolo 1 de 6 a 9 animais do grupo controle (naïve ou sham), ligadura 14 dias (ligaduras posicionadas e eutanásia no dia 14) e ligadura 21 dias (ligaduras posicionadas e eutanásia no dia 21). Dados apresentaram distribuição normal (teste Shapiro-Wilk) e foram analisados por ANOVA de uma via seguido por comparação múltipla de Tukey. * $p < 0.05$ entre os grupos

6.1.3 Análise histológica cardíaca dos ratos em um modelo experimental de periodontite: descritiva e avaliação qualitativa do infiltrado inflamatório

Para analisar as alterações no tecido cardíaco de ratos com periodontite experimental em diferentes tempos experimentais, os grupos foram eutanasiados nos dias 14° e 21° do experimento e seus corações foram removidos para análise histológica descritiva e qualitativa. Os animais dos grupos sham (protocolo 1) e naïve na análise microscópica dos tecidos miocárdicos exibiram estrutura e morfologia normais, com ausência de células inflamatórias e de lesão celular. Nos animais do protocolo 1, com periodontite experimental eutanasiados ao 14° ou 21°, dia foi observado aumento na presença de fibroblastos comparado ao grupo controle, bem

como presença de células inflamatórias dispersas e próximas aos vasos sanguíneos, sendo estas células observadas apenas mononucleares. Na análise qualitativa os cortes foram avaliados ao microscópio óptico em aumento de 20x e receberam escores (0,1,2, 3 e 4) quanto à presença do infiltrado inflamatório. Sendo 0- ausente,1-pouco presente, 2- moderadamente 3- presente e 4-excessivamente presente. O GRÁFICO 3 mostra os os escores dos animais submetidos a eutanásia ao 14° ou 21° dia. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e ligadura 14 e 21 dias.

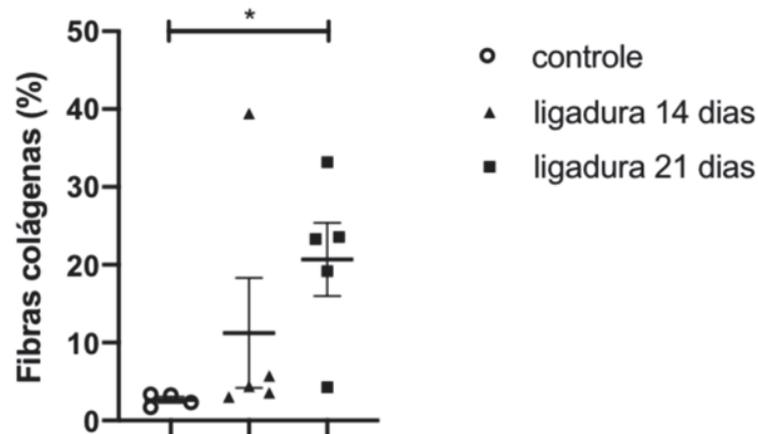


FONTE: O autor (2023).

GRÁFICO 3: Análise do infiltrado inflamatório em escores do ventrículo esquerdo de animais do grupo controle ou ligadura (14 ou 21 dias). Dados expressos em média \pm SE e analisados por Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p=0.0006$ entre os grupos; # $p=0.0009$ entre os grupos.

6.1.4 Análise histológica cardíaca dos ratos em um modelo experimental de periodontite: quantificação de fibras colágenas

Para analisar a presença de fibras colágenas no tecido cardíaco de ratos com periodontite experimental em diferentes tempos experimentais, foram confeccionadas lâminas com coloração Tricrômico de Mallory. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e ligadura 21 dias (GRÁFICO 4).

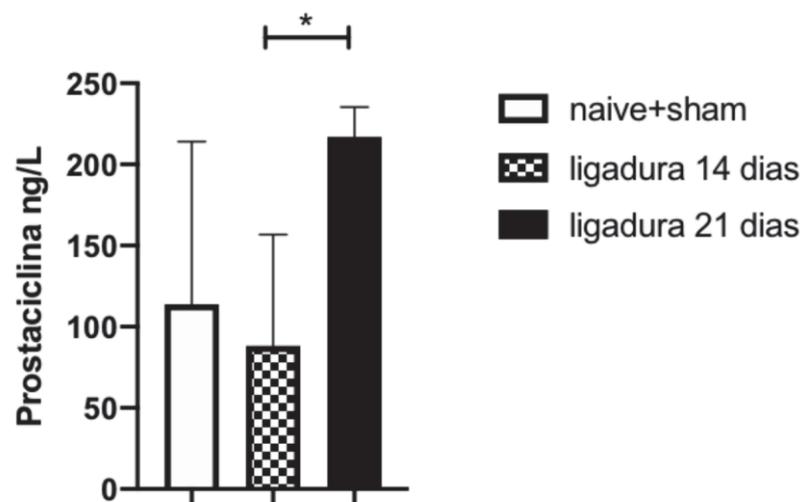


FONTE: O autor (2023).

GRÁFICO 5: Análise de fibras colágenas em porcentagem do ventrículo esquerdo de animais do grupo controle ou ligadura (14 ou 21 dias). Dados expressos em média \pm SE e analisados por Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p=0.02$ entre os grupos.

6.1.5 Dosagem de prostaciclina dos ratos em um modelo experimental de periodontite

Na análise dos valores da dosagem de prostaciclina dos animais do protocolo 1, podemos observar no GRÁFICO que houve diferença estatística entre os grupos ligadura 14 e 21 dias.



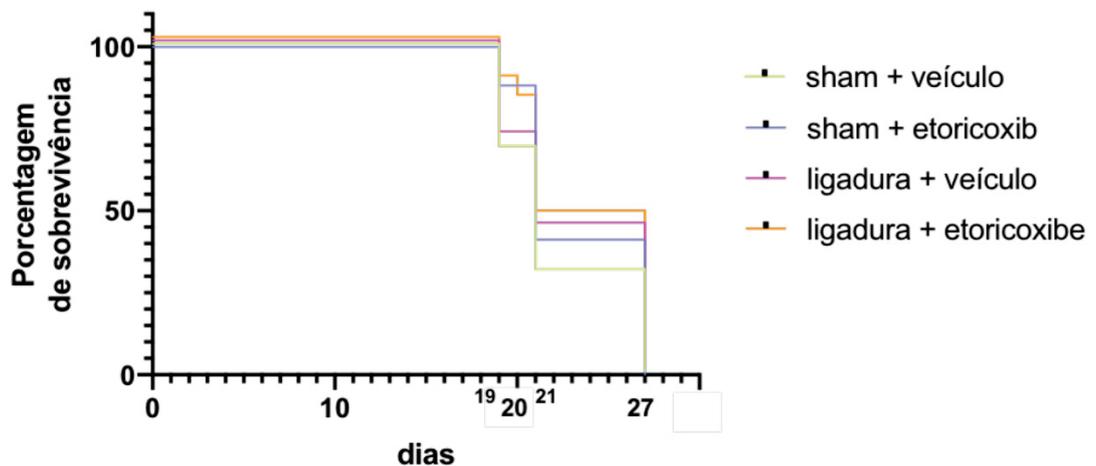
FONTE: O autor (2023).

GRÁFICO 6: Dados expressos em média \pm DP dos valores de Prostaciclina (ng//L) de 5 a 8 animais do grupo controle (naïve ou sham), ligadura 14 dias (ligaduras posicionadas e eutanásia no dia 14) e ligadura 21 dias (ligaduras posicionadas e eutanásia no dia 21). Dados com distribuição normal analiados por ANOVA de uma via seguido por pós teste de Tukey.. * $p=0.01$.

6.2 RESULTADOS: PROTOCOLO 2

6.2.1 Curva de mortalidade após a indução de lesão de isquemia cardíaca

Durante a fase experimental da indução de lesão de isquemia cardíaca induzida por isoprenalina ocorreu a morte de alguns animais. No GRÁFICO 7, podemos observar os dados referentes à mortalidade com a porcentagem de sobrevivência dos animais submetidos a lesão de isquemia cardíaca de acordo com o grupo. A mortalidade foi semelhante ente os grupos e não houve diferença estatisticamente significativa.



FONTE: O autor (2023).

GRÁFICO 7- Curva de mortalidade com a porcentagem de sobrevivência após lesão de isquemia cardíaca dos grupos sham + veículo, sham + etoricoxibe, ligadura + veículo e ligadura + etoricoxibe (n=16 a 18 por grupo). A colocação das ligaduras ou falsa-cirurgia foram realizadas no dia 0. Do dia 14 ao 21 os animais foram tratados com veículo ou etoricoxibe. Nos dias 19 e 20 os animais passaram por modelo de lesão isquêmica cardíaca. Os animais foram eutanasiados nos dias 21 ou 27. Foi utilizado o teste Logrank para comparação, $p=0.3543$.

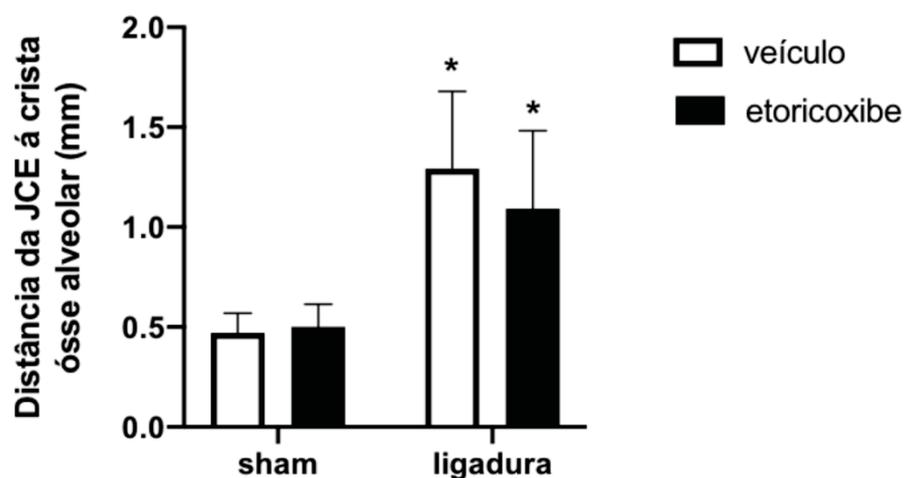
6.2.2 Perda óssea alveolar média em um modelo experimental de periodontite com inibição de COX-2

No vigésimo primeiro ou no vigésimo sétimo dia os animais foram eutanasiados e tiveram suas mandíbulas e maxilas removidas para quantificação da perda óssea alveolar nos diferentes grupos. Não houve diferença estatística entre os grupos ligadura que receberam ou veículo (GRÁFICO 8 E TABELA 1).

TABELA 1 – Dados analisados por ANOVA de duas vias seguida por pos hoc Bonferroni. Foi utilizado o software GraphPad Prism versão 8. ^A Diferença estatística entre os grupos. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo.

Variável	Tratamento	Sham (n=6)	Ligadura (n=8)	ANOVA	F-valor	p-valor
Distância JCE à crista óssea alveolar	Veículo	0.471±0.098	1.293±0.387 ^A	Periodontite-tratamento	33.58	<0.0001
	etoricoxibe	0.501±0.113	1.093±0.390 ^A		0.4828	0.4944
Interação					0.8943	0.3546

FONTE: O autor (2023).

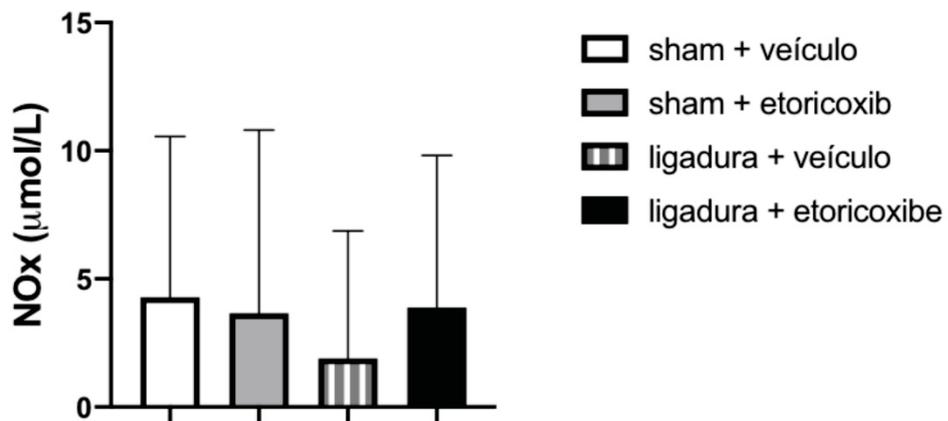


FONTE: O autor (2023).

GRÁFICO 8: Análise morfométrica da perda óssea alveolar em animais do protocolo 2. Imagem representativa da distância da junção cimento esmalte à crista óssea alveolar (mm) do segundo molar superior esquerdo dos animais. Todos os dentes com ligadura apresentaram o mesmo padrão de perda óssea alveolar. Os dados estão expressos em média \pm SD e foram analisados por ANOVA de duas vias seguida por pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$

6.2.3 Quantificação de nitrito e nitrato (NOx) em um modelo experimental de periodontite e indução de lesão isquemia cardíaca

No GRÁFICO 9, estão expressos os dados de animais eutanasiados no 27º dia de experimento, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.



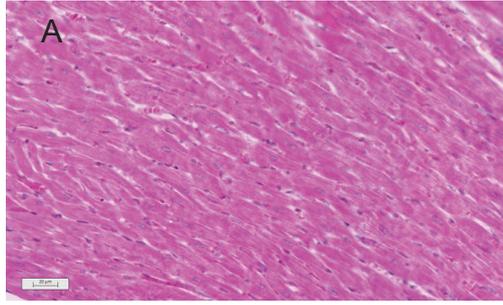
FONTE: O autor (2023).

GRÁFICO 9: Dados expressos em média \pm DP dos valores de NOx ($\mu\text{mol/L}$) do protocolo 2. De 5 a 8 animais dos grupos sham + veículo, sham+etoricoxibe, ligadura + veículo e ligadura + etoricoxibe. A colocação das ligaduras ou falsa-cirurgia foram realizadas no dia 0. Do dia 14 ao 21 os animais foram tratados com veículo ou etoricoxibe. Nos dias 19 e 20 os animais passaram por modelo de lesão isquêmica cardíaca. A eutanásia foi realizada no dia 27. Dados foram analisados por Kruskal-Wallis. $p > 0.05$

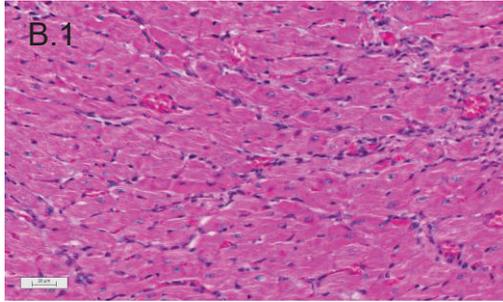
6.2.4 Análise histológica cardíaca dos ratos submetidos a lesão de isquemia cardíaca em um modelo experimental de periodontite com inibição de COX-2: análise descritiva e avaliação qualitativa do infiltrado inflamatório

Para analisar histologicamente os efeitos da inibição da COX-2 em ratos com periodontite e lesão de isquemia cardíaca. Os animais foram eutanasiados randomicamente nos dias 21º ou 27º dia do experimento e seus corações foram removidos para análise histológica descritiva e qualitativa. Nos animais do protocolo 2, ao qual todos foram submetidos a injeção de isoprenalina por dois dias consecutivos, todos os grupos apresentaram a presença de células inflamatórias

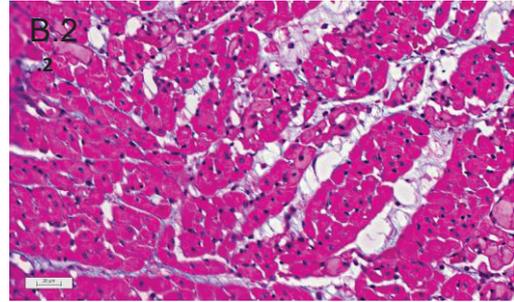
com hegemonia para células mononucleares, predominantemente linfócitos, uma quantidade inferior de células polimorfonúcleares foi observada, o infiltrado inflamatório foi gradativamente aumentado respectivamente nos grupos sham+veículo, sham+etoricoxibe; ligadura+veículo e ligadura+etoricoxibe ao 27° dia de eutanásia. Foram observadas lesões multifocais, núcleos situados periféricamente, pequenos e profundamente corados (picnóticos), enquanto outros estavam situados centralmente e circundados por halos, bem como fragmentação de cardiomiócitos, edema celular, cariólise, espaço intertissular aumentado, capilares sanguíneos dilatados e congestionados no grupo ligadura + etoricoxibe eutanasiado no 27° dia comparado aos demais, neste grupo pode-se observar Infiltrado/fibrose de células inflamatórias do miocárdio superior aos demais. Na análise qualitativa os cortes foram avaliados ao microscópio óptico, em aumento de 20x, e receberam escores (0,1, 2, 3 e 4) quanto à presença do infiltrado inflamatório. Sendo 0- ausente, 1-pouco presente, 2- moderadamente presente e 3- presente e 4-excessivamente presente. A FIGURA 10 mostra os cortes histológicos realizados de animais submetidos à eutanásia ao 21° (B.2; C.2; D.2 e E.2) ou ao 27° dia (B.1; C.1; D.1 e E.1) Estatisticamente houve diferença significativa entre os grupos sham-veículo e ligadura-etoricoxibe eutanasiados no 27° dia (GRÁFICO 10).



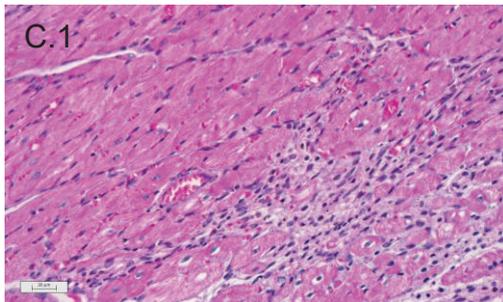
A- Grupo controle



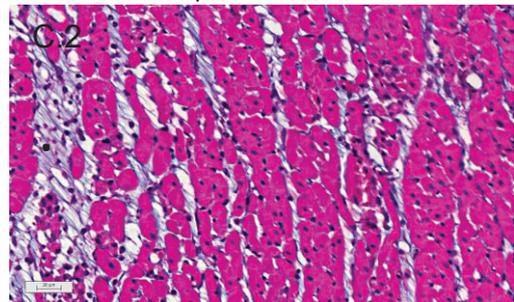
B.1- Grupo Sham+veículo – 27° dia



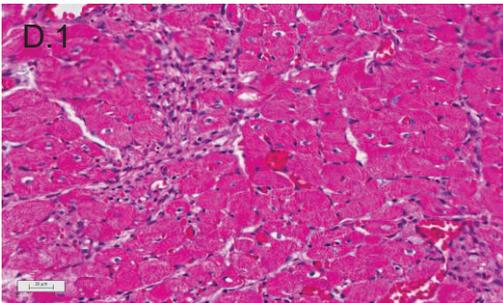
B.2- Grupo Sham+veículo – 21° dia



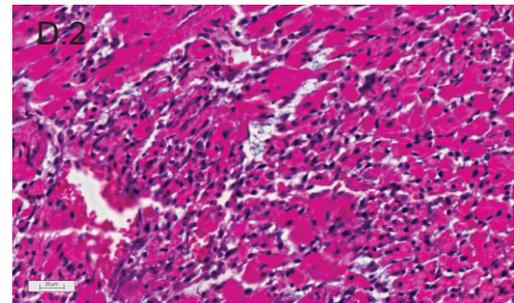
C.1- Grupo Sham+etorixibe -27° dia



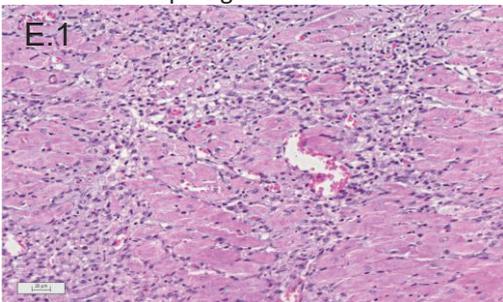
C.2- Grupo Sham+etorixibe -21° dia



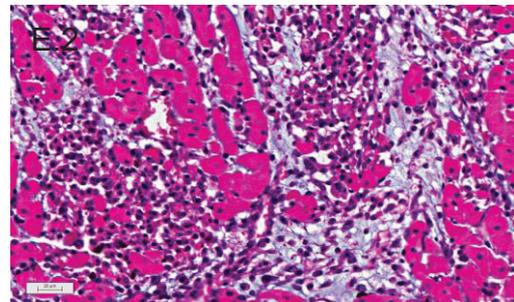
D.1- Grupo Ligadura+veículo- 27° dia



D.1- Grupo Ligadura+veículo- 21° dia

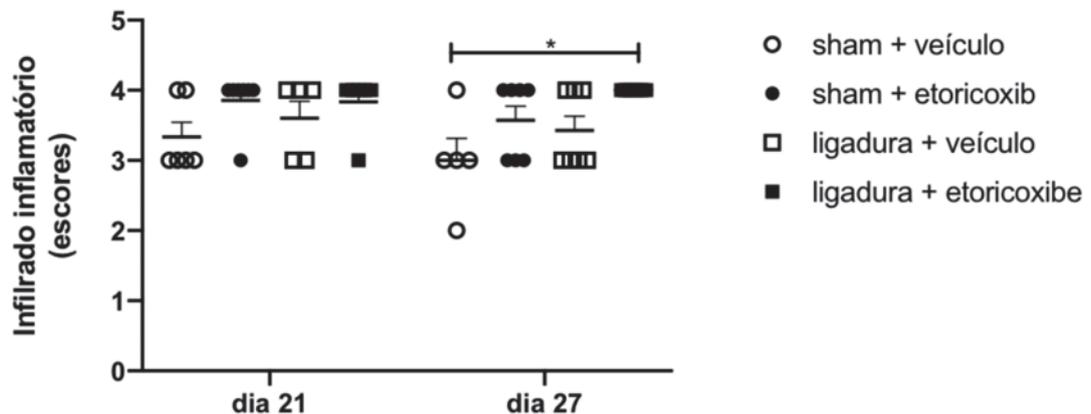


E.1- Grupo Ligadura+etorixibe- 27° dia



E.1- Grupo Ligadura+etorixibe- 21° dia

FIGURA 10: As imagens representam a região do ventrículo esquerdo em coloração de hematoxilina e eosina para análise do infiltrado inflamatório grupos naive, sham + veículo, sham+etoricoxibe, ligadura + veículo e ligadura + etoricoxibe. A colocação das ligaduras ou falsa-cirurgia foram realizadas no dia 0. Do dia 14 ao 21 os animais foram tratados com veículo ou etoricoxibe. Nos dias 19 e 20 os animais passaram por modelo de lesão isquêmica cardíaca. Os animais foram eutanasiados nos dias 21 ou 27.



FONTE: O autor (2023).

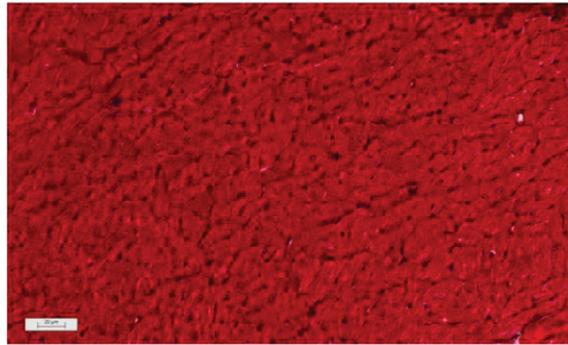
GRÁFICO 10: Análise do infiltrado inflamatório em escores do ventrículo esquerdo dos grupos sham + veículo, sham+etoricoxibe, ligadura + veículo e ligadura + etoricoxibe. A colocação das ligaduras ou falsa-cirurgia foram realizadas no dia 0. Do dia 14 ao 21 os animais foram tratados com veículo ou etoricoxibe. Nos dias 19 e 20 os animais passaram por modelo de lesão isquêmica cardíaca. Os animais foram eutanasiados nos dias 21 ou 27. Dados expressos em média \pm SE e analisados por Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. * $p=0.02$ entre os grupos.

6.2.5 Análise histológica cardíaca dos ratos submetidos a lesão de isquemia

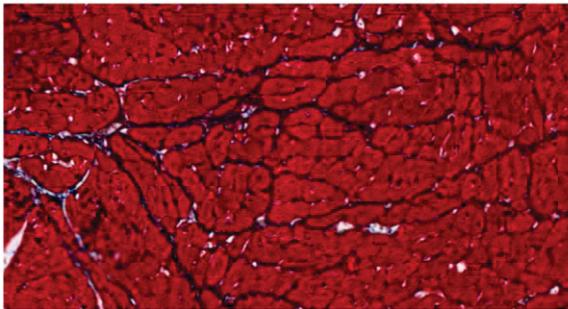
cardíaca em um modelo experimental de periodontite com inibição de COX-2:
quantificação de fibras colágenas

Com o objetivo de avaliar a presença de fibras colágenas no tecido cardíaco dos animais infartados, foram confeccionadas lâminas com coloração Tricrômico de Mallory dos animais do protocolo 2 eutanasiados 21° e 27° dia de experimento (FIGURA 11). Na imagem A observamos o grupo controle, e nas imagens B.1, C.1,

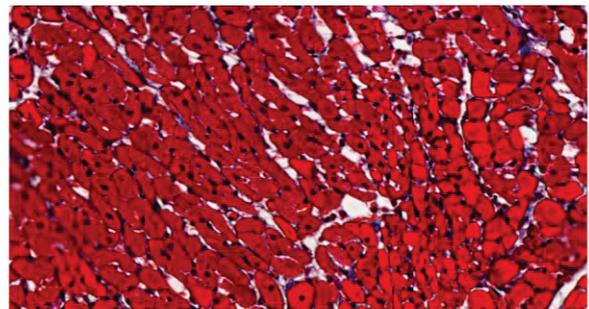
D.1 e E.1 os animais eutanasiados ao 27° dia, e ao 21° dia (B.2 , C.2, D.2 e E.2), observa-se a presença de concentrações fibras colágenas. Estatisticamente houve diferença significativa entre os grupos ligadura + etoricoxibe eutanasiados no 21 ° dia e 27° . (GRÁFICO 13).



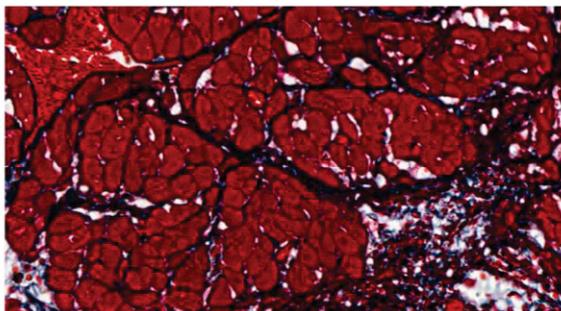
A- Grupo controle



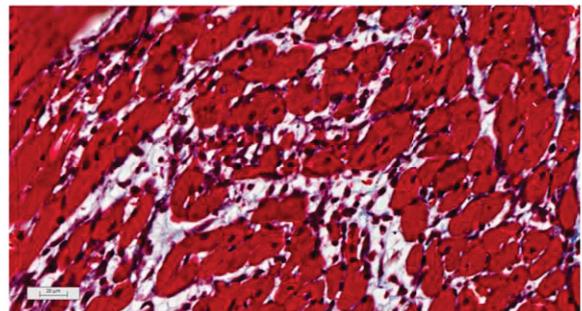
B.1- Grupo Sham+veículo – 27° dia



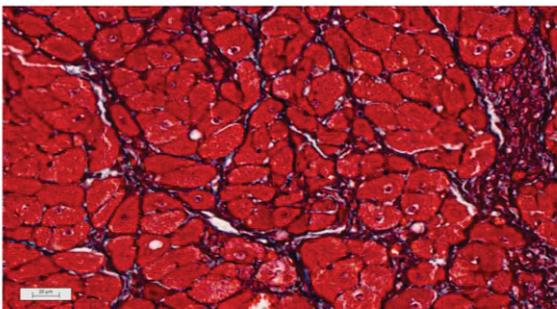
B.2- Grupo Sham+veículo – 21° dia



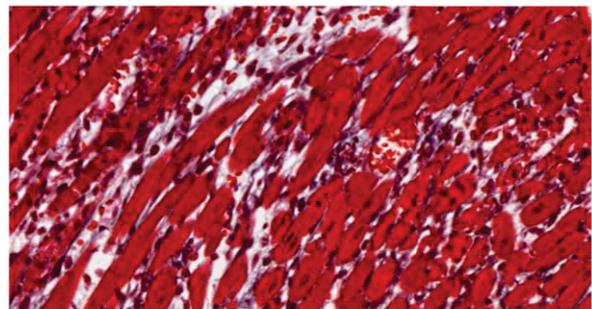
C.1- Grupo Sham+etorixoxibe -27° dia



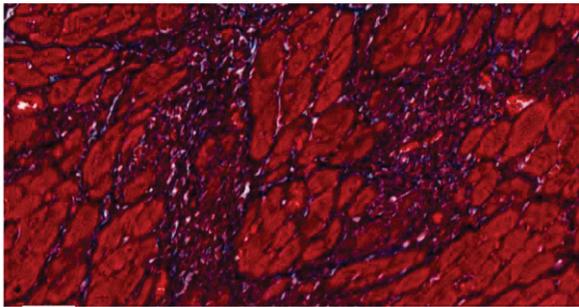
C.2- Grupo Sham+etorixoxibe -21° dia



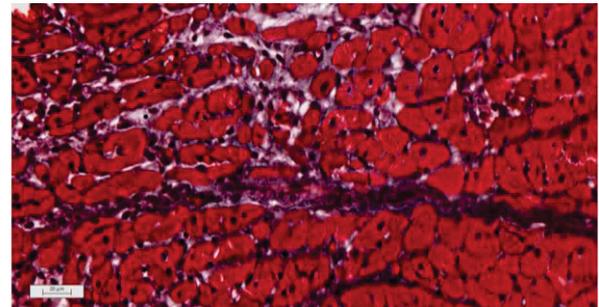
D.1- Grupo Ligadura+veículo- 27° dia



D.1- Grupo Ligadura+veículo- 21° dia



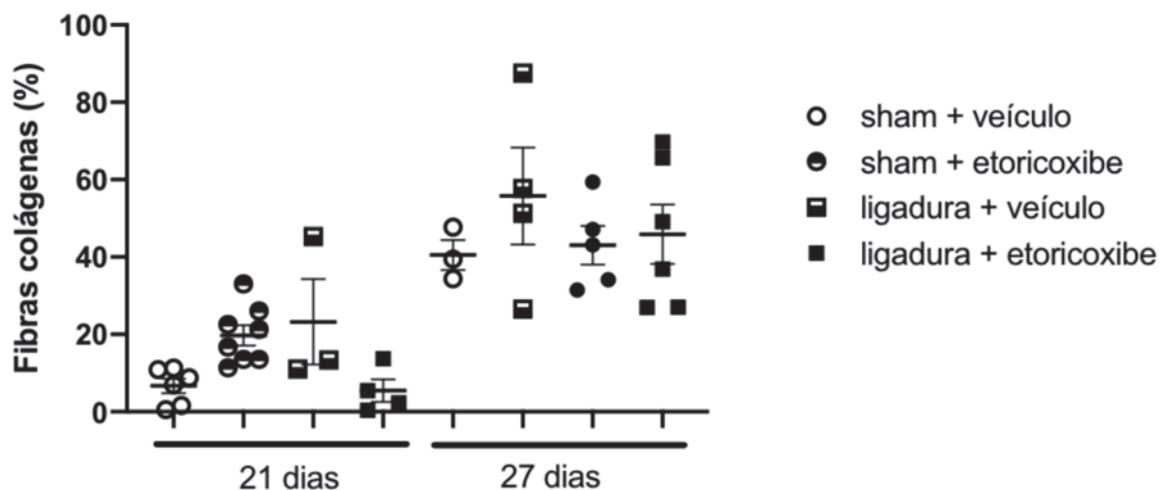
E.1- Grupo Ligadura+etorixoxibe- 27° dia



E.2- Grupo Ligadura+etorixoxibe- 21° dia

FONTE: O autor (2023).

FIGURA 11: As imagens representam a região do ventrículo esquerdo em coloração de Tricrômico de Mallory para análise fibras colágenas entre os grupos naive, sham + veículo, sham+etoricoxibe, ligadura + veículo e ligadura + etoricoxibe. A colocação das ligaduras ou falsa-cirurgia foram realizadas no dia 0. Do dia 14 ao 21 os animais foram tratados com veículo ou etoricoxibe. Nos dias 19 e 20 os animais passaram por modelo de lesão isquêmica cardíaca. Os animais foram eutanasiados nos dias 21 ou 27. Grupo controle (A), 27 (B.1, C.2, D.2 e E.2) e 21 dias (B.1, C.1, D.1 e E.1)

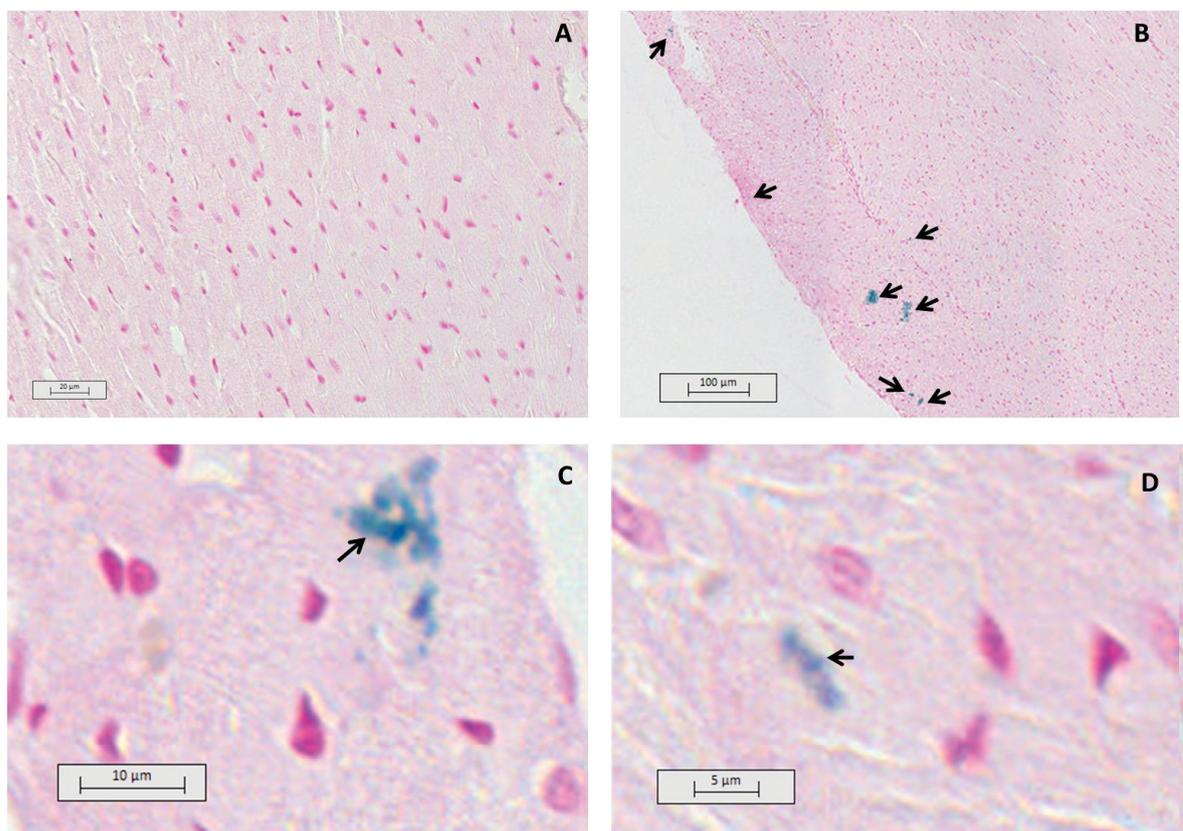


FONTE: O autor (2023).

GRÁFICO 13: Análise fibras colágenas em porcentagem do ventrículo esquerdo dos grupos sham + veículo, sham+etoricoxibe, ligadura + veículo e ligadura + etoricoxibe. A colocação das ligaduras ou falsa-cirurgia foram realizadas no dia 0. Do dia 14 ao 21 os animais foram tratados com veículo ou etoricoxibe. Nos dias 19 e 20 os animais passaram por modelo de lesão isquêmica cardíaca. Os animais foram eutanasiados nos dias 21 ou 27. Dados expressos em média \pm SE e analisados por Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn.

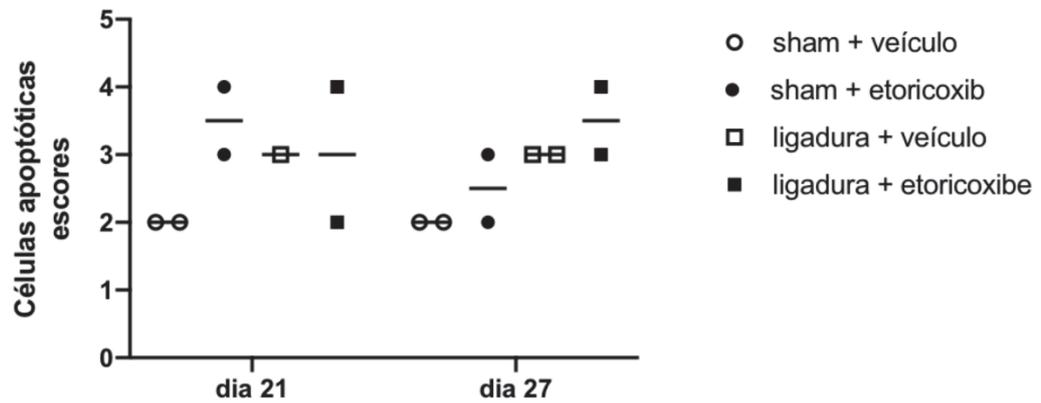
6.2.6 Detecção de apoptose in situ no tecido cardíaco de ratos submetidos a lesão de isquemia cardíaca em um modelo experimental de periodontite com inibição de COX-2

Os animais do protocolo 2, eutanasiados no 21° ou 27° dia de experimento, foram submetidos à análise de células apoptóticas. As lâminas (FIGURA 12) receberam escores (0,1,2, 3 e 4) quanto à presença de células apoptóticas. Sendo 0- ausente, 1-pouco, 2- moderadamente 3- presente e 4- muito presente (GRÁFICO 14).



FONTE: O autor (2023).

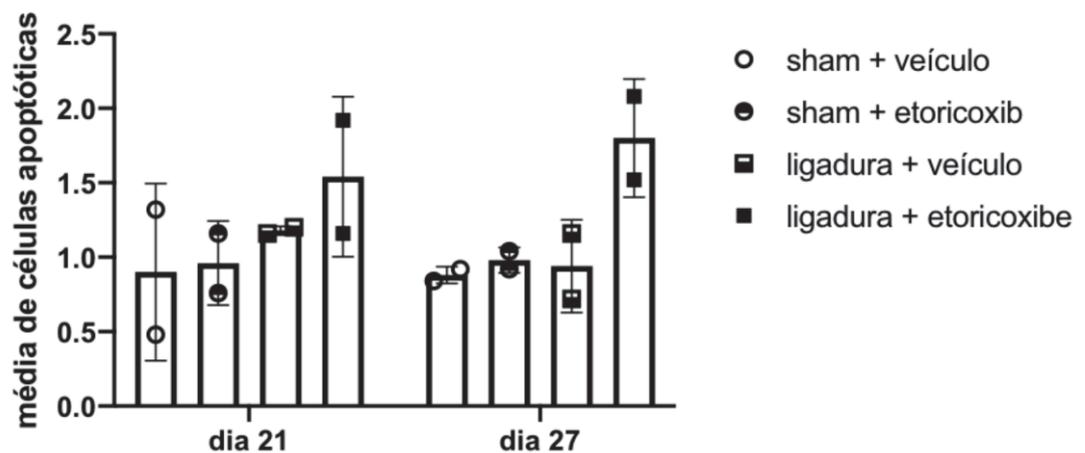
FIGURA 12: Detecção de apoptose In Situ CardioTACS™ no tecido cardíaco de ratos com periodontite experimental e indução lesão isquêmica cardíaca, imagem A animal do grupo controle e imagem B, C e D animais dos grupos ligadura+ etoricoxibe.



FONTE: O autor (2023).

GRÁFICO 14: Análise de células apoptóticas em escores do ventrículo esquerdo dos grupos sham + veículo, sham+etoricoxibe, ligadura + veículo e ligadura + etoricoxibe. A colocação das ligaduras ou falsa-cirurgia foram realizadas no dia 0. Do dia 14 ao 21 os animais foram tratados com veículo ou etoricoxibe. Nos dias 19 e 20 os animais passaram por modelo de lesão isquêmica cardíaca. Os animais foram eutanasiados nos dias 21 ou 27. n= 1 ou 2 animais por grupo. Realizada apenas análise descritiva.

Na análise quantitativa para células positivas ao ensaio (GRÁFICO 15), observa-se que nos grupos ligadura + etoricoxibe a presença de células apoptóticas foi maior. Foram utilizados de um a dois animais por grupo, logo, os resultados foram analisados de forma descritiva.



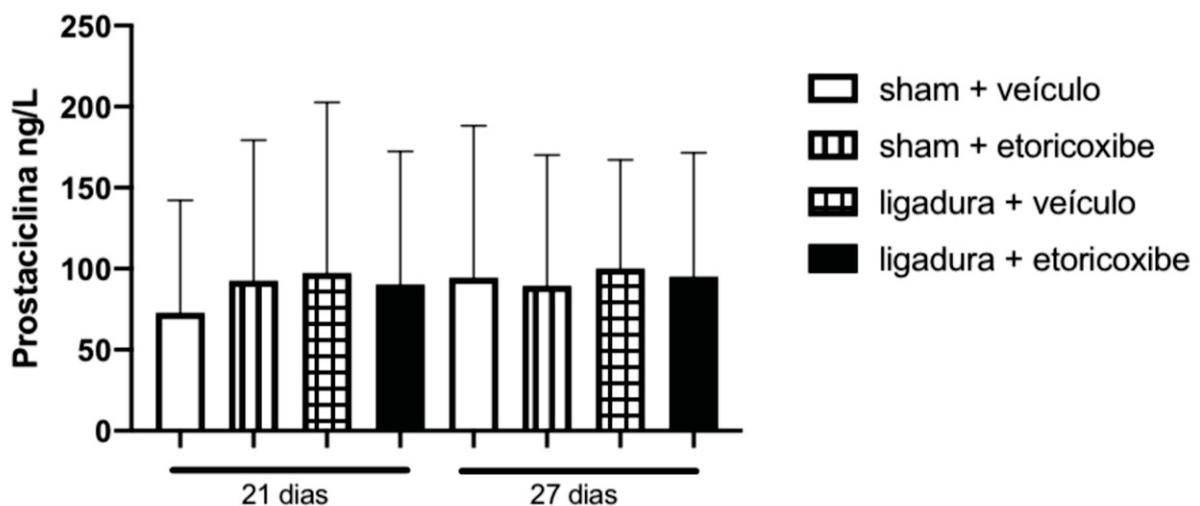
FONTE: O autor (2023).

GRÁFICO 15: Média ± DP do número de células apoptóticas por campo do ventrículo esquerdo dos grupos sham + veículo, sham + etoricoxibe, ligadura + veículo e ligadura + etoricoxibe. A colocação

das ligaduras ou falsa-cirurgia foram realizadas no dia 0. Do dia 14 ao 21 os animais foram tratados com veículo ou etoricoxibe. Nos dias 19 e 20 os animais passaram por modelo de lesão isquêmica cardíaca. Os animais foram eutanasiados nos dias 21 ou 27. n= 2 animais por grupo. Realizada apenas análise descritiva.

6.2.7 Dosagem de prostaciclina de ratos submetidos a lesão de isquemia cardíaca em um modelo experimental de periodontite com inibição de COX-2

Os valores de prostaciclina presente no plasma dos animais do protocolo 2 podem ser observados no GRÁFICO 16. Não houve diferença estatística entre os grupos.



FONTE: O autor (2023).

GRÁFICO 16: Dados expressos em média \pm DP dos valores de Prostaciclina (ng//L) de 5 a 8 animais dos grupos sham + veículo, sham+etoricoxibe, ligadura + veículo e ligadura + etoricoxibe. A colocação das ligaduras ou falsa-cirurgia foram realizadas no dia 0. Do dia 14 ao 21 os animais foram tratados com veículo ou etoricoxibe. Nos dias 19 e 20 os animais passaram por modelo de lesão isquêmica cardíaca. Os animais foram eutanasiados nos dias 21 ou 27. Dados analisados por Kruskal-Wallis. Sem diferença estatística entre os grupos.

7 DISCUSSÃO

Um levantamento epidemiológico em escala nacional, realizado em 2010 pelo Ministério da Saúde, denominado Projeto SB Brasil (saúde bucal) evidenciou que o percentual de indivíduos com doença periodontal foi de 37% para a idade de 12 anos, 49,1% para a faixa de 15 a 19 anos, 82,2% para os adultos de 35 a 44 anos e 98,2% nos idosos de 65 a 74 anos. O novo Projeto de SB Brasil, pactuado para 2020, tinha como previsão de início 2021, mas teve a execução estendida em decorrência da emergência sanitária do coronavírus (SECRETARIA DE ATENÇÃO PRIMÁRIA A SAÚDE (SAPS), 2023).

Diversos estudos com metodologias variadas (MENDONÇA et al. 2018, 2019; LIMA et al., 2020; BATISTA et al., 2011) demonstram que indivíduos com periodontite têm maior risco de doença cardiovascular do que aqueles sem a doença, ou ainda com formas mais brandas da doença (AKHI et al., 2019). A periodontite é considerada pela Sociedade Brasileira de Cardiologia como um indicador para o estado de saúde cardiovascular (SIMÃO et al., 2013). Estudos experimentais, clínicos e translacionais exploram os mecanismos contidos na associação ente DP e DCVs. As principais vias incluem a disbiose do microbiota oral, vias inflamatórias, padrões moleculares associados a patógenos e padrões moleculares associados a danos, receptores de reconhecimento de padrões, via entero-salivar do nitrato-nitrito-óxido nítrico, disfunção endotelial e modificações epigenéticas. Tendo em vista essas vias de ligações diretas e indiretas, alguns estudos propõem a DP como um fator de risco modificável não tradicional emergente para DCVs (CARRIZALES-SEPÚLVEDA et al., 2018 ;DEL PINTO et al., 2020; PRIYAMVARA et al., 2020; ALTAMURA et al., 2023).

Decorrente da periodontite, é gerada uma inflamação sistêmica de baixo grau pela produção e transbordamento para a corrente sanguínea de mediadores inflamatórios, há aumento na expressão de moléculas e produção de espécies reativas de oxigênio, que afetam a função endotelial. Especificamente, o TNF- α e a IL-6 são citados como responsáveis pela redução da produção de NO e, conseqüentemente, pela disfunção endotelial, que está relacionada ao aumento da expressão de COX-2 (GURAV, 2014; TSIOUFIS et al., 2011). Apesar de a isoforma da COX-2 ser marcadamente inflamatória, sua inibição se relaciona positivamente a desordens cardíacas (MENDES, 2012).

Modelos animais são amplamente utilizados para investigação da doença periodontal na literatura, sendo relatado o uso de diversas espécies. Um dos animais mais utilizados na literatura em estudos de periodontite experimental é o rato, pois apresenta baixo custo para manutenção, sua manipulação é fácil e apresenta características do periodonto, bem como da patogênese da doença periodontal e da microbiota semelhantes ao homem, além de a doença progredir para uma destruição crônica em poucas semanas, o que otimiza as pesquisas. Entre as espécies mais utilizadas destacam-se Wistar e Sprague-Dawley (STRUILLOU et al., 2010). É considerado um modelo válido e adequado para estudar a relação entre periodontite e comorbidades sistêmicas (HAJISHENGALLIS et al., 2021).

A escolha de indução de doença periodontal neste estudo foi a ligadura. Além da ligadura, outras formas de indução da periodontite experimental são relatadas, com destaque para a introdução de microorganismos patogênicos por meio de gavagem e por meio de injeções de bactérias inativadas ou LPS bacteriano, (DE MOLON, 2012) Estes métodos de fato são muito utilizados para estabelecer doença periodontal em modelos animais, entretanto esses métodos levam mais tempo – em torno de quatro a seis semanas – para produzir perda óssea significativa quando comparado ao uso da ligadura, além de terem um custo mais elevado (LIN et al., 2021).

A maioria dos estudos utiliza uma ou duas ligaduras para avaliar os efeitos locais da periodontite (KOSE et al., 2017; RIBEIRO et al., 2021; KOCAMAN et al., 2021). Pesquisas anteriores têm mostrado que para o desenvolvimento de alterações sistêmicas é necessário o uso de no mínimo três ligaduras (MA et al., 2011). A fim de proporcionar uma inflamação de maior magnitude para avaliação das alterações sistêmicas, neste estudo utilizamos quatro ligaduras de fio de algodão em ratos Wistar. Metodologia que está de acordo com estudos prévios (BRITO et al., 2013; OLCZHANEHSKI et al., 2018).

Os estudos de MENDES et al., 2012, MORO et al., 2019, HOLZHAUSEN et al., 2002 mostram que quando iniciado precocemente, o uso do inibidor seletivo da COX-2 previne a perda óssea decorrente da periodontite em modelos experimentais. Semelhante resultado foi encontrado no estudo de Azoubel et al., (2005), em que a inibição da COX-2 foi iniciada 5 dias após a instalação das ligaduras. No presente estudo, o inibidor seletivo da COX-2 utilizado, etoricoxibe, não apresentou efeito protetor para a perda óssea alveolar, pois o seu uso foi iniciado no décimo quarto dia

de indução da doença, quando o processo inflamatório já estava estabelecido. Estes resultados também foram encontrados no estudo de Mendes et al., (2014). Essa ausência de efeito sobre a perda óssea alveolar era esperada considerando o tempo de início de tratamento. Ademais, neste trabalho o objetivo foi avaliar o efeito sistêmico da inibição da COX-2.

Em uma revisão sistemática com meta-análise realizada em 2023, por ISIRDIA-ESPINOZA et al., com o objetivo de avaliar a eficácia analgésica dos inibidores da COX-2 *versus* outras drogas na cirurgia periodontal, os autores concluíram que os agentes inibitórios seletivos da COX-2 produzem melhor alívio da dor em comparação com o placebo ou outras drogas (AINEs- não seletivos da COX-2 e glicocorticosteróides) após a cirurgia periodontal. Apesar de sua extensa utilidade terapêutica relatada na literatura, a segurança do uso dos inibidores seletivos da COX-2 durante processos inflamatórios crônicos – assim como a periodontite – ainda não está estabelecida. Sabe-se que os COXIBES podem elevar o risco de complicações cardiovasculares, o que contraindica o uso dessas medicações a esses pacientes específicos. Porém, o uso durante demais processos inflamatórios crônicos requer investigação.

Ao longo dos anos houve uma intensa busca científica a respeito da segurança e associação de risco ao sistema cardiovascular pelo uso dos inibidores seletivos da COX-2. Como no estudo do VIGOR que mostrou que o uso prolongado de rofecoxib está associado ao dobro do risco de ataque cardíaco ou acidente vascular cerebral comparado ao placebo (BOMBARDIER et al., 2000). Adicionalmente, evidências científicas demonstraram que as complicações no sistema cardiovascular inerentes ao uso de COXIBES são relacionadas ao uso contínuo (SALVO et al., 2014; FITZGERALD, 2004). Em 2016 o fabricante de cápsulas de celecoxibe, Pfizer, financiou dois estudos: Macdonald et al., (2017) e Nissen et al., (2016). No estudo de Nissen et al., (2016) realizado para o FDA, foram selecionados participantes que necessitavam do uso de AINEs para osteoartrite ou artrite reumatoide e apresentavam maior risco cardiovascular, o estudo foi denominado Prospective Randomized Evaluation of Celecoxib Integrated Safety versus Ibuprofen or Naproxen (PRECISION) e em um segundo estudo realizado por Macdonald et al., (2017), denominado: Randomized trial of switching from prescribed non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs to prescribed celecoxib: the Standard care vs. Celecoxib Outcome Trial (SCOT) para a European Medicines

Agency (EMA) comparando a segurança cardiovascular de mudar para celecoxibe versus continuar a terapia com anti-inflamatórios não esteróides não seletivos convencionais em um ambiente europeu, no qual os autores relatam que eventos cardiovasculares adversos foram infrequentes e semelhantes com celecoxib e AINEs, sem vantagem de uma estratégia de troca de AINEs prescritos por celecoxib prescritos (MACDONALD et al., 2017). No estudo realizado em 2016, concluíram que, em relação aos riscos cardiovasculares, não existe diferença significativa entre esses três AINEs (NISSEN et al., 2016). Vários outros estudos também relacionaram o risco de DCV com AINEs (FITZGERALD, 2004). A meta-análise forneceu evidências de que o risco de eventos CV é ligeiramente elevado em muitos AINEs (TRELLE et al., 2011), mas o estudo PRECISION mostrou que esses riscos não diferem significativamente entre o celecoxibe e outros AINEs comumente usados (AILANI et al., 2023). Segundo Bindu et al., (2020), apesar de esses ensaios clínicos randomizados fornecerem evidências 'padrão-ouro', suas interpretações são questionadas na comunidade científica. Em 2017, FITZGERALD apontou uma série de questões relacionadas à interpretação do estudo PRECISION (FITZGERALD, 2017). Bindu et al., (2020) mencionam que independente das nuances da interpretação de diferentes estudos, não há dúvida sobre a ligação entre o uso de AINEs e a saúde cardiovascular comprometida.

O desequilíbrio entre TXA2 e PGI2 é uma possível explicação para as injúrias cardiovasculares (BINDU et al., 2020.) Uma correlação positiva entre o aumento da potência inibitória do PGHS-2 com o aumento dos incidentes de DCVs foi relatado por Garcia-Rodriguez et al., (2008). Contrariamente aos estudos que utilizaram pacientes com uso contínuo de COXIBEs, estudos propuseram dúvidas sobre o risco de eventos coronarianos com doses baixas por curto prazo, o que é o caso do uso sobre prescrição médica para controle da dor aguda ou febre (MOORE et al., 2020). No Brasil, apenas o celecoxibe e o etoricoxibe são comercializados, ambos com retenção de receita médica (RESOLUÇÃO RDC79).

Nesta pesquisa optou-se pela utilização do fármaco Etoricoxibe, pois quando comparado ao Celecoxibe apresenta seletividade pela COX-2 muito superior (SAXENA et al., 2005). Uma possibilidade para inibição seletiva da COX-2 é a utilização de compostos químicos exclusivos para uso laboratorial, estes apresentam altas taxas de seletividade e especificidade (QUEIROZ-JUNIOR et al., 2009) porém optou-se pelo uso de um medicamento disponível ao uso clínico, desta forma

aproximando-se da prática clínica diária profissional. A administração da medicação foi iniciada ao décimo quarto dia, período em que de acordo com o Protocolo 1, os animais já apresentaram uma perda óssea alveolar bem estabelecida com diferença entre os grupos sham e ligadura ($p < 0,05$). Nota-se também que não houve diferença na perda óssea alveolar entre os animais eutanasiados aos 14 ou 21 dias, o que mostra que aos 14 dias os animais parecem entrar em uma fase crônica da inflamação. O que converge com dados já mostrados na literatura, com a presença de alterações sistêmicas (GRAVES et al., 2012).

Para avaliar o papel da COX-2 na fisiopatologia das alterações cardiovasculares induzidas pela periodontite, utilizou-se um modelo de indução de infarto com elevadas doses subcutâneas de isoprenalina para posterior análise histológica do tecido cardíaco, este modelo foi reportado anteriormente em outros trabalhos (FILHO et al., 2011; ASAIKUMAR et al., 2019). Há outros modelos animais de IAM que necessitam de uma cirurgia invasiva. Um método muito utilizado para induzir o IAM é a obstrução da artéria coronária. Para isso há a necessidade de exposição do coração por meio de toracotomia, abertura do saco pericárdico e a oclusão da artéria coronária com sutura (JOHNS; OLSON, 1954; CAMILLERI et al., 1981). Ainda que seja um modelo frequentemente utilizado, a cirurgia de tórax aberto em roedores pequenos ocasiona uma alta taxa mortalidade no perioperatório, devido aos riscos anestésicos, do processo cicatricial das feridas cirúrgicas e das reações inflamatórias. Além de requerer habilidade cirúrgica e ainda pode resultar em infartos de tamanhos variáveis (VAN DEN BOS et al., 2005).

Em nosso estudo, a indução da lesão isquêmica cardíaca foi realizada por meio da administração de isoprenalina (25 mg/kg, s.c) por dois dias consecutivos. A dose utilizada foi determinada através de testes realizados previamente por nosso grupo de pesquisa. Em relação à taxa de mortalidade após a indução de lesão isquêmica cardíaca, em nosso estudo foi em média de 25%. No estudo de Acikel et al em (2005) foi de 33,33% e no estudo de FILHO et al., (2011) a mortalidade foi de 25%. Não houve diferença na taxa de sobrevivência entre nossos grupos experimentais ($p = 0.3543$). A indução da periodontite e/ou inibição da COX-2 pareceram não interferir na taxa de mortalidade imediata após lesão isquêmica.

A avaliação das alterações histológicas no tecido cardíaco caracterizadas pelo infiltrado inflamatório foram realizadas de forma descritiva e qualitativamente através dos escores. Na análise qualitativa do infiltrado inflamatório do protocolo 1,

houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e ligadura 14 e 21 dias. ($p < 0,05$). Esses dados juntamente com os achados histopatológicos mostram que apenas a indução da periodontite é suficiente para gerar alterações no tecido cardíaco dos animais.

No estudo Yu et al., (2009), em um modelo animal, utilizando cães com periodontite induzida por quatro ligaduras, a análise histológica do tecido cardíaco, demonstrou que a presença de infiltrado inflamatório foi estatisticamente significativa em átrios do grupo periodontite ($p < 0,05$), porém apesar da elevação do infiltrado inflamatório nos ventrículos, a análise não foi estatística significativa. Já no estudo de Kose et al., (2017), em que a indução da periodontite ocorreu por meio de duas ligaduras durante 35 dias, houve maior infiltração de células inflamatórias, degeneração de miócitos e alterações endoteliais capilares nos animais com periodontite ($p < 0,05$). Komacan et al., (2021), em um modelo animal com a colocação de somente uma ligadura por 30 dias, demonstrou diferença estatística na prevalência de cardiomiócitos, graus de desorganização, deformidade, hialinização, vacuolização intracitoplasmática e picnose nuclear no grupo periodontite comparado ao controle ($p < 0,05$).

A fim de avaliar a interação entre periodontite, doenças cardiovasculares e inibição seletiva da COX-2, foi realizado o protocolo 2 como previamente descrito. Na análise descritiva pode-se observar uma maior fragmentação de cardiomiócitos, edema celular, cariólise, espaço intersticial aumentado, capilares sanguíneos dilatados e congestionados, infiltrado/fibrose de células inflamatórias do miocárdio no grupo ligadura + etoricoxibe eutanasiado no 27° dia comparado aos demais, assim como na análise qualitativa, estatisticamente houve diferença significativa entre os grupos sham-veículo e ligadura-etoricoxibe eutanasiados no 27° dia ($p < 0,05$). Tanto na análise qualitativa quanto os achados na análise descritiva, o infiltrado inflamatório mais significativo foi nos grupos que tinham a associação de periodontite e a administração da medicação inibitória da COX-2. Logo, a inibição seletiva da COX-2 parece exacerbar alterações cardíacas induzidas por isoprenalina em modelos de periodontite.

Em relação à análise de porcentagem de fibras colágenas do ventrículo esquerdo, os animais do protocolo 1 apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e ligadura 21 dias. ($p < 0,05$). Resultado similar foi encontrado no estudo Kose et al., 2017, em que houve significativa acúmulo de

colágeno no grupo de animais com periodontite em comparação ao grupo controle após 35 dias ($p < 0,05$). No protocolo 2 não houve diferença nos grupos eutanasiados ao 21° dia, bem como entre os grupos eutanasiados ao 27° dia. Segundo Frangogiannis, em 1996, após o terceiro dia de infarto ocorre o acúmulo de colágeno tipos I e III e somente torna-se bem organizado após 14 dias, isso explica a menor quantidade de fibras colágenas observada neste estudo, visto que os animais foram eutanasiados após 24 horas ou 7 dias da lesão isquêmica, período bastante inferior quando comparamos ao estudo como de Ramom, em 2011, em que as análises foram realizadas sessenta dias pós indução de infarto. A cicatrização do miocárdio pós-infarto é dividida em diferentes estágios: necrose, inflamação e fibrose, proliferação e remodelamento. E a longo prazo, maturação (DOBACZEWSKI; GONZALEZ-QUESADA; FRANGOGIANNIS, 2010). O processo de cicatrização do miocárdio é vital para assegurar a integridade do coração e é chamado de fibrose de reparação (TANAKA et al., 2016). Uma resposta fibrótica exacerbada pode originar disfunção sistólica e diastólica, maior suscetibilidade a arritmias devido à alteração da sinalização intercelular, levando ao comprometimento da função cardíaca (FRANCIS STUART et al., 2016). A redução da contratilidade geral do lado esquerdo do ventrículo pode ser afetada por um aumento persistente na quantidade de colágeno tipos I e III, isso gera alterações na organização estrutural do endomísio e perimísio e violação das propriedades eletromecânicas do coração (SHEVCHENKO; PLOTNITSKY; ULBASHEV, 2023).

No protocolo 1 houve redução na biodisponibilidade de NOx aos 14 dias. Esta redução foi restaurada aos 21 dias ($p < 0,05$). O NO está relacionado a processos inflamatórios e sua redução caracteriza uma disfunção endotelial. Neste estudo, ao 21° dia houve restabelecimento dos níveis iniciais de NO. No estudo de Ribeiro et al., (2021), os autores induziram a periodontite experimental por meio de 02 ligaduras durante 14 dias, o NO foi quantificado pelo método de quimiluminescência no plasma, e foi observado aumento significativo dos níveis plasmáticos de NO nos animais do periodontite experimental comparado ao controle. Níveis altos de NO aumentam o dano de proteínas e lipídios celulares, levando à progressão da doença periodontal. A doença periodontal também tem sido associada à disfunção endotelial transitória (RIBEIRO et al., 2021). Estudos clínicos têm demonstrado que pacientes com periodontite apresentaram aumento da concentração plasmática de NO (nitrito e nitrato) (MENAKA, et al., 2009).

No protocolo 2 a quantificação de nitrito e nitrato (NOx) foi realizada apenas nos animais eutanasiados ao 27° dia, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0.05$). No estudo de Behal et al., (2009) e Lv et al., (2007) exibiram um aumento na biodisponibilidade de NO. A elevação do NO indica um processo inflamatório crônico, por meio do aumento da expressão da INOS, produzindo assim proporções maiores de NO. Em contrapartida, a diminuição do NO caracteriza uma disfunção endotelial, está por sua vez pode ser desencadeada por uma resposta inflamatória. Sabe-se que a atividade biológica do NO reduzida, ocasionada pela redução na síntese e o aumento da degradação pelo estresse oxidativo, tem sido identificada como o mecanismo de maior impacto no processo multifatorial na disfunção endotelial e na participação das principais disfunções cardiovasculares (DIAS et al., 2011). A diminuição na biodisponibilidade do NO e a disfunção endotelial determinam, no ambiente vascular, o desencadeamento de eventos como alterações no tônus, disfunções trombóticas, proliferação e migração de células musculares lisas (CML), e adesão de leucócitos (MADAMANCHI, VENDROV, RUNGE, 2005). Por sua vez a resposta inflamatória gerada pode não ser suficiente para induzir uma expressão de iNOS, mas pode ser suficiente para causar disfunção endotelial e, portanto, diminuir a produção de NO pela eNOS. Estudos têm relacionado o aumento da inflamação com a diminuição da disponibilidade de NO, promovendo evidências de que inflamação ou infecção crônica podem causar disfunção endotelial (TEIXARA et al., 2014).

Estudos tem demonstrado que a inibição de PGHS pode levar ao acúmulo de AA que pode aumentar a disfunção mitocondrial cardíaca (BINDU et al., 2020) Em análises de microarray de cardiomiócitos tratados com diclofenaco e celecoxibe, a expressão dos genes associados à sinalização de cálcio e potássio foram significativamente afetados pelos AINEs, juntamente com o envolvimento das principais vias de sinalização, incluindo a apoptose. (OH et al., 2018) No presente estudo, um Kit de Detecção de Apoptose In Situ CardioTACS™ (4827-30-K) foi usado para detectar células apoptóticas no tecido cardíaco. Foram realizadas análises qualitativa e quantitativa, de forma descritiva Ambas análises mostraram maior presença de células apoptóticas nos grupos ligadura + etoricoxibe, o que reforça a sugestão de que a associação da periodontite experimental e a inibição seletiva da COX-2 pode ser potencialmente deletéria e levar à apoptose celular.

Em relação aos resultados dos valores médios de prostaciclina, no protocolo 1 houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos 14 e 21 dias ($p=0.01$). No protocolo 2, esperava-se diferença entre os grupos uma vez que na Inibição seletiva da COX-2, pode ocorrer uma redução na quantidade de prostaciclina (PGI₂) produzida no endotélio (MUSCARÁ et al. (2000). No entanto, não houve diferença entre os grupos experimentais do protocolo 2 nos valores médios de prostaciclina. As espécies reativas do oxigênio (EROs) são geradas em grande quantidade durante o estresse oxidativo, em altas concentrações podem danificar organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (VALCO et al. 2007). As enzimas antioxidantes são primeira linha de defesa contra as espécies ativas de oxigênio (BELLO-KLEIN et., 2001) porém estudos indicam que sua atividade enzimática é reduzida em tecidos submetidos a situações isquêmicas (KHAPER, SINGAL, 2001; HILL, SINGAL, 1997) e o aumento na concentração EROs pode inibir a atividade enzimática (MIYAMOTO et al., 2006). Estudos demonstraram as EROs reduziram a produção do vasodilatador prostaciclina, danificando o endotélio e diminuindo a capacidade das células de converter o ácido araquidônico em prostaciclina (KANU et al., 2011).

O presente estudo sugere que a inibição seletiva da COX-2, em ratos com periodontite, pode exacerbar alterações cardiovasculares, como maior quantidade de infiltrado inflamatório e fibras colágenas. A realização de mais estudos é necessária, para melhor entendimento da relação da doença periodontal e inibidores seletivos de COX2 com o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, bem como verificar a segurança do uso desses fármacos durante processos inflamatórios sistêmicos.

8 CONCLUSÃO

- Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a inibição seletiva da COX-2 durante um processo inflamatório crônico, como a periodontite, pode exacerbar alterações nos tecidos cardiovasculares;
- O etoricoxibe não preveniu a perda óssea alveolar em um modelo de periodontite experimental quando iniciado ao 14º de indução da doença;
- O grupo Ligadura+etoricoxibe eutanasiado ao 27º dia de experimento apresentou a maior quantidade de fibras colágenas no tecido cardíaco após isquemia cardíaca induzida por isoprenalina;
- Os grupos Ligadura+etoricoxibe eutanasiados ao 21º ou ao 27º dia de experimento apresentaram um maior infiltrado inflamatório no tecido cardíaco após isquemia cardíaca induzida por isoprenalina;
- O número de células apoptóticas foi maior nos grupos Ligadura+etoricoxibe eutanasiados ao 21º ou ao 27º dia de experimento após isquemia cardíaca induzida por isoprenalina;
- Não houve diferença na quantificação de NOx dos animais do protocolo 2, o que sugere que as alterações observadas não tenham interferência da via do óxido nítrico.

9 AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC; # 2021TR000442).

REFERÊNCIAS

ABE, T.; HAJISHENGALLIS G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. **J Immunol Methods**. v 394, n 1-2, p49-54, Aug. 2013.

ABOU-SALEH, H.; HACHEM, A.; YACOUB, D.; et al. Endothelial progenitor cells inhibit platelet function in a P-selectin-dependent manner. **J Transl Med**. v 7, n 13, p142, May. 2015.

AILANI, J.; NAHAS, SJ.; FRIEDMAN, DI.; et al. The Safety of Celecoxib as an Acute Treatment for Migraine: A Narrative Review. **Pain Ther**. v 12, n 3, p655-669. Jun. 2023.

AGUILERA, EM.; SUVAN, J.; BUTI, J.; et al. Periodontitis is associated with hypertension: a systematic review and meta-analysis. **Cardiovascular Research**. v 1, n 116, p28-39, Jan. 2020.

AKHI, R.; WANG, C.; NISSINEN, AE. Salivary IgA to MAA-LDL and Oral Pathogens Are Linked to Coronary Disease. **Journal of dental research**, v 98, n 3, p296–303. 2019.

AL-SALAM, S.; HASHMI, S.; JAGADEESH, GS.; Tariq S. Galectin-3: A Cardiomyocyte Antiapoptotic Mediator at 24-Hour Post Myocardial Infarction. **Cell Physiol Biochem**. v 4, n 54, n 2, p287-302. Apr. 2020.

ALTAMURA, S.; DEL PINTO, R.; PIETROPAOLI, D.; et al Oral health as a modifiable risk factor for cardiovascular diseases. **Trends in cardiovascular medicine**, p1050-1738. 2023.

ANDRUKHOV, O.; HARIRIAN, H.; BERTL, K.; et al. Nitric oxide production, systemic inflammation and lipid metabolism in periodontitis patients: possible gender aspect. **J Clin Periodontol**. v 40, n 10, p916-923, Oct. 2013.

ASAIKUMAR, L.; VENNILA, L.; AKILA, P.; et al. Preventive effect of nerolidol on isoproterenol induced myocardial damage in Wistarrats: Evidences from biochemical and histopathological studies. **Drug Dev Res**. v 80, n 6 ,p814-823. Sep. 2019.

AZOUBEL, MC.; MENEZES, AM.; BEZERRA, D.; et al. Comparison of etoricoxib and indomethacin for the treatment of experimental periodontitis in rats. **Braz J Med Biol Res**. v 40, n 1, p117-25, jan. 2007.

BALTACIOĞLU, E.; YUVA, P.; AYDIN, G.; et al. Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and

aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease?. **J Periodontol.** v 85, n 10, p1432-41. Oct. 2014.

BATISTA, RM.; ZANDONADE, E.; ROELKE, LH.; et al. Associação entre doença periodontal e aterosclerose subclínica: uma revisão sistemática. **Jornal Vascular Brasileiro.** v 10, n 3, p229-238, 2011.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios Não Esteroides: efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. São Paulo: **Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.** v. 94, n. 4, p. 556–563, abr. 2010.

BECK, J.; GARCIA, R.; HEISS, G.; et al. Periodontal disease and cardiovascular disease. **J Periodontol.** v 67, n 10, p1123-37, out. 1996.

BEDI, T.; MAHENDRA, J.; AMBALAVANAN, N. Defensins in periodontal health. **Indian J Dent Res.** v 26, n 4, p340-4. Jul-Aug. 2015.

BELLO-KLEIN, A.; BOCK, PM.; TRAVACIO, M.; et al. Myocardial oxidative stress and antioxidants in hypertension as a result of nitric oxide synthase inhibition. **Cardiovasc Toxicol.** v 1, n 1, p43-50. 2001.

BEHAL, N.; KANVAR, S.; SHARMA P.; et al Effect of non-steroidal antiinflammatory drug etoricoxib on the hematological parameters and enzymes of colon and kidney. **Nutr Hosp.** v 24. N 3, p326-32. May-Jun. 2009 .

BELUQUE, T. **Efeitos da inibição da cox-2 no sistema cardiovascular de cães.** Monografia (Bacharelado-Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária. 2014.

BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochem Pharmacol.** v 180, p114-147, Oct. 2020.

BOMBARDIER, C.; LAINE, L.; REICIN, A.; et al. VIGOR Study Group. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. **N Engl J Med.** v 343, n 21, p1520-1528, Nov. 2000.

BRITO, LC.; DALBÓ, S.; STRIECHEN, TM.; et al. Experimental periodontitis promotes transient vascular inflammation and endothelial dysfunction. **Arch Oral Biol.** v 58, n 9, p1187-98, Sep. 2013.

BROWN, GCJFB. Nitric oxide and mitochondria. **Front Biosci.** v 12, n 6, p1024-1033, 2007.

BRUNTON, LL.; LAZO, JS.; PARKER, KL et al. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, p.1821 2007.

CAMILLERI, J. P. et al. Experimental Myocardial Infarction in the Rat as a Quantitative Model for the Study of Anti-Ischemic Interventions. **Pathology Research and Practice**. v 172, n 1–2, p42–52, 1981.

CARDOSO, EM.; REIS, C.; MANZANARES-CÉSPEDES, MC. Chronic periodontitis, inflammatory cytokines, and interrelationship with other chronic diseases. **Postgraduate medicine**. v. 130, n. 1, p98-104, 2018.

CARRIZALES-SEPÚLVEDA, EF.; ORDAZ-FARIÁS, A.; VERA-PINEDA, R.; et al. Periodontal Disease, Systemic Inflammation and the Risk of Cardiovascular Disease. **Heart, lung & circulation**, v 27, n 11, p1327–1334. 2018.

CATON, JG.; ARMITAGE, G.; BERGLUNDH, T., et al. A New Classification Scheme For Periodontal And Peri-Implant Diseases And Conditions - Introduction And Key Changes From The 1999 Classification. **J Clin Periodontol**. v 20, n 45, p1-8, jun. 2018.

CERQUEIRA, NF.; YOSHIDA, WB. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v 17, n 6, p417–423, 2002.

CINELLI, MA.; DO, HT.; MILEY, GP.; et al. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. **Med Res Rev**. v 40, n 1, p158-189, 2020.

CHAHADE, W.; GIORGI, RDN.; SZAJUBOK, JCM. Anti-inflamatórios não hormonais. **Einstein**. São Paulo, v 6, n 1, p166-174, 2008.

CUNHA, FA.; COSTA, FO.; CUNHA MAGM. Periodontal diseases and cardiovascular diseases: scientific evidence and biological plausibility. **ImplantNewsPerio** . v 1, n 6, p1201-1204, ago-set. 2016.

DEL PINTO, R.; PIETROPAOLI, D.; MUNOZ-AGUILERA et al.;. Periodontitis and Hypertension: Is the Association Causal?. **High blood pressure & cardiovascular prevention : the official journal of the Italian Society of Hypertension**. v 274, p281–289. 2020.

DEMMER, RT.; TRINQUART, L.; ZUK, A.; et al. The influence of anti-infective periodontal treatment on C-reactive protein: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **PLoS One**. v 14, n 8, p77441 oct. 2013.

DESCHAMPS-LENHARDT, S.; MARTIN-CABEZAS, R.; HANNEDOUCHE, T.; et al. Association between periodontitis and chronic kidney disease: Systematic review and meta-analysis. **Oral Diseases**. v 25, n 2, p385-402, 2018.

DOBACZEWSKI, M.; GONZALEZ-QUESADA, C.; FRANGOGIANNIS, N. G. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. Mar. 2010.

DIAS, RG.; NEGRÃO, CE.; KRIEGER, MH. Óxido nítrico e sistema cardiovascular: ativação celular, reatividade vascular e variante genética. **Arquivos Brasileiros De Cardiologia**. v 96, n 1, p68–75. 2011.

DOBACZEWSKI, M.; GONZALEZ-QUESADA, C.; FRANGOGIANNIS, N. G. The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. Mar. 2010.

EISERICH, JP.; BALDUS, S.; BRENNAN, ML.; et al. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. **Science**. v 296, p2391–4, 2002.

EKUNI, D.; TOMOFUJI, T.; SANBE, T.; et al. Periodontitis-induced lipid peroxidation in rat descending aorta is involved in the initiation of atherosclerosis. **J Periodontal Res**. v 44, n 4, p434-42, Aug. 2009.

EMERY, P. Clinical implications of selective cyclooxygenase-2 inhibition. **Scand J Rheumatol Suppl**. v 102, p23-8. 1996.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Public CHMP assessment report for medicinal products containing non selective steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs)**. Doc. Ref. EMEA/H/A-5.3/800, 2006.

EZZATI, M.; RIBOLI, E. Can non-communicable diseases be pre-vented? Lessons from studies of population and individuals. **Science**. v 21, n 337(6101), p1482-7. Sep. 2012.

FEBBRAIO, M.; ROY, CB.; LEVIN, L. Is There a Causal Link Between Periodontitis and Cardiovascular Disease? A Concise Review of Recent Findings. **Int Dent J**. v 72, n 1, p37-51, feb. 2022.

FERLAZZO, N.; CURRÒ, M.; ISOLA, G.; et al. Changes in the Biomarkers of Oxidative/Nitrosative Stress and Endothelial Dysfunction Are Associated with Cardiovascular Risk in Periodontitis Patients. **Curr Issues Mol Biol**. v 43, n 2, p704-715. Jul. 2021.

FITZGERALD GA. Coxibs and cardiovascular disease. **N Engl J Med.** V 351, n 17, p1709-11, 2004.

FITZGERALD, GA. Imprecision: Limitations to Interpretation of a Large Randomized Clinical Trial. **Circulação.** v 135, n 2, p113–115. 2017.

FRANCIS STUART, SD.; DE JESUS, NM.; LINDSEY, ML.; Ripplinger CM. The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction. **J Mol Cell Cardiol.**v 11, p114-22. Feb. 2016.

FILHO, HGL.; FERREIRA, NL.; SOUSA, RB.; et al. Modelo 47 experimental de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery,** v 26, n 3, p469-476. 2011.

FORSTERMANN, U.; CLOSS, EI.; POLLOCK, JS.; et al. Nitric oxidesynthase isozymes:characterization, purification, molecular cloning and functions. **Hypertension.** v 23, n 6 Pt 2, p1121-31, Jun. 1994.

GALLI, G.; PANZETTA G. Do non-steroidal anti-inflammatory drugs and COX-2 selective inhibitors have different renal effects? **J Nephrol.** v 15, p480-8, 2002.

GARCIA RODRIGUEZ, LA.; TACCONELLI S.; PATRIGNANI P. Role of dose potency in the prediction of risk of myocardial infarction associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the general population. **J. Am. Coll. Cardiol.** v 52, n 20, p1628–1636, 2008.

GENCO, RJ.; BORGNAKKE WS. Risk factors for periodontal disease. **Periodontol** 2000. v 62, n 1, p59-94, jun. 2013.

GRANGER, DL.; HIBBS, JB Jr.; PERFECT, JR.; et al. Metabolic fate of L- arginine in relation to microbiostatic capability of murine macrophages. **Clin Invest.** v 85, n 1, p264-73, Jan. 1990.

GRAVES, DT.; KANG, J.; ANDRIANKAJA, O.; et al. Animal models to study host bacteria interactions involved in periodontitis. **Front Oral Biol.** v 15, n 1, p117-32. 2012.

GURAV NA. A implicação da periodontite na disfunção endotelial vascular. **EUR. J. Clin. Investigar.** v 44, p1000–1009. 2014

GUZIK, TJ.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **J Physiol Pharmacol.** v 54, n 4, p469-487, Dec. 2003.

HAJISHENGALLIS G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nat Rev Immunol**. v 15, n 1, p30-44, jan, 2015.

HAJISHENGALLIS, G.; CHAVAKIS T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. **Nat Rev Immunol**. V 21, n 7, p426-440, jul. 2021.

HERRERA, BS.; MARTINS-PORTO, R.; CAMPI, P.; et al. Local and cardiorenal effects of periodontitis in nitric oxide-deficient hypertensive rats. **Arch Oral Biol**. v 56, n 1, p41-7, jan. 2011.

HIENZ SA, PALIWAL S, IVANOVSKI S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. **J Immunol Res**. p:615486. 2015.

HIGASHI, Y.; GOTO, C.; JITSUIKI, D. et al. Periodontal infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients. **Hypertension**. v 51, n 2, p446-453, 2008.

HILL, MF.; SINGAL, PK.; Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. **Circulation**. v 96, n 7, p2414-20.1997.

HOLMLUND, A.; LAMPA, E.; LIND, L. Oral health and cardiovascular disease risk in a cohort of periodontitis patients. **Atherosclerosis**. v 262, p101-106, jul. 2017.

ISIORDIA-ESPINOZA. MA.; GÓMEZ-SÁNCHEZ, E.; MORA-FALCÓN. IJ.; et al. Analgesic Efficacy of COX-2 Inhibitors in Periodontal Surgery: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Healthcare (Basel)**. 6;11(7):1054. Apr. 2023.

JAGADISH, R.; MEHTA, DS. Comparative evaluation of the efficacy of the cyclooxygenase pathway inhibitor and nitric oxide synthase inhibitor in the reduction of alveolar bone loss in ligature induced periodontitis in rats: An experimental study. **J Indian Soc Periodontol**. v 8, n 1, p59-64. Jan. 2014.

JEFFCOAT, MK.; JEFFCOAT, RL.; GLADOWSKI, PA.; et al. Impact of periodontal therapy on general health: evidence from insurance data for five systemic conditions. **Am J Prev Med**. v 47, n 2, p166-74, Aug. 2014.

JEPSEN, S.; CATON, JG.; ALBANDAR, JM.; et al. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and 30 31 acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop 32 on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of Clinical Periodontology**. v 89, n 1, p237-248, jun. 2018.

JONES R. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Prescribing: Past, Present, and Future. **Am J Med**, v 110, n 0, p4-7, 2001.

JOHNS, TNP.; OLSON, BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. **Annals of surgery**, v 140, n 5, p675– 46, Nov. 1954.

JOSHI, C.; BAPAT, R.; ANDERSON, W.; et al. Detection of periodontal microorganisms in coronary atheromatous plaque specimens of myocardial infarction patients: A systematic review and meta-analysis. **Trends Cardiovasc Med**. v 31, n 1, p69-82, jan. 2021.

JOSHIPURA, KJ.; RIMM, EB.; DOUGLASS, CW.; et al. Poor oral health and coronary heart disease. **J Dent Res**. v 75, p1631–1636, 1996.

KANU, A., LEFFLER, CW. Arachidonic acid- and prostaglandin E2-induced cerebral vasodilation is mediated by carbon monoxide, independent of reactive oxygen species in piglets. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v 30, n 1,-6, p2482-7. Dec. 2011.

KASSEBAUM, NJ.; BERNABÉ, E.; DAHIYA, M.; et al. Carga global de periodontite grave em 1990–2010: uma revisão sistemática e metaregressão. **J Dent Res**. v 93, n 11, p1045–53, 2014.

KASSIER, SM. Periodontal disease and non-communicable diseases. Strength of bidirectional associations. **S. Afr. Dent. J.** Johannesburg, v. 71, n. 9, p404-409, Oct. 2016.

KHAPER, N.; SINGAL, PK.; Modulation of oxidative stress by selective inhibition of angiotensin II type 1 receptors in rats. **J Am Coll Cardiol**. v 37, n 5, p1461-6. 2001

KINGWELL, BA. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. **FASEBJ**. v 14, p1685-96, 2000.

KOPPOLU, P.; DURVASULA, S.; PALAPARTHY, R.; et al. Estimate of CRP and TNF-alpha level before and after periodontal therapy in cardiovascular disease patients. **Pan Afr Med J**. v 10, n 15, Jul, 2013.

KOSE, O; ARABACI, T.; GEDIKLI, S.; et al. Biochemical and histopathologic analysis of the effects of periodontitis on left ventricular heart tissues of rats. **J Periodont Res**. v 52, n 2, p176-185. Apr. 2017.

KRÓL, M.; KEPINSKA, MJIJOMS. Human Nitric Oxide Synthase—Its Functions, Polymorphisms, and Inhibitors in the Context of Inflammation, Diabetes and Cardiovascular Diseases. **Int J Mol Sci.** v 22, n 1, 2020.

KWON, T.; LAMSTER, IB.; LEVIN, L. Current Concepts in the Management of Periodontitis. **Int Dent J.** v 71, n 6,p462-476, Dec. 2021.

LEUTI, A.; FAZIO, D.; FAVA, M.; et al. Bioactive lipids, inflammation and chronic diseases. **Adv Drug Deliv Rev.** v 159, p133-169, 2020.

LEHNINGER, AL.; NELSON, KY. **Princípios de Bioquímica.** 4. ed. São Paulo: Savier, p. 599-630. 2006.

LIMA, LVR.; DE FRANÇA, JVEL.; MAPURUNGA, BPR.; et al. Periodontal disease as a risk factor for cardiovascular changes: An analysis of the literature. **Brazilian Journal of Health Review.** v. 3, n. 3, p4370–4382, 2020.

LIN, P.; NIIMI, H.; OHSUGI, Y.; Application of Ligature-Induced Periodontitis in Mice to Explore the Molecular Mechanism of Periodontal Disease. **Int J Mol Sci.** v 22, p 16, p 8900. Aug. 2021.

LING, MR.; CHAPPLE, IL.; MATTHEWS, JB, (2016). Neutrophil superoxide release and plasma C-reactive protein levels pre- and post-periodontal therapy. **J Clin Periodontol.** v 43, n 8, p652-8, ago, 2016.

LIPSKY, PE.; BROOKS, P; CROFFORD, LJ.; et al. Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease. **Arch Intern Med.** v 10, n 7. p913-20, Apr. 2000.

LIU, JY.; LI, N.; YANG, J.; et al. Metabolic profiling of murine plasma reveals an unexpected biomarker in rofecoxib-mediated cardiovascular events. **Proc Natl Acad Sci USA.** v 107, n 39, p17017-22, Sep. 2010.

LIU, X.; LI H. A Systematic Review and Meta-Analysis on Multiple Cytokine Gene Polymorphisms in the Pathogenesis of Periodontitis. **Front Immunol.** v 3 , n 12, p713-198. Jan. 2022.

LV, PP.; FAN, Y.; CHEN, WL.; ET AL. COX-2 inhibitor nimesulide protects rat heart against oxidative stress by improving endothelial function and enhancing NO production. **Sheng li xue bao : Acta physiologica Sinica.** V 59, n 5, p674–680. 2007.

MA, KS.; HASTURK, H.; CARRERAS, I.; et al. Dementia and the Risk of Periodontitis: A Population-Based Cohort Study. **J Dent Res.** v 101, n 3, p270-277, Mar. 2022.

MA, S., GUO, J., YOU, X. et al. Expressions of interleukin-1 β and interleukin-6 within aortas and uteri of rats with various severities of ligature-induced periodontitis. **Inflammation**, v 34 , p260–268, 2011.

MACDONALD, TM.; HAWKEY, CJ.; FORD, I.; et al. Randomized trial of switching from prescribed non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs to prescribed celecoxib: the Standard care vs. Celecoxib Outcome Trial (SCOT). **Eur Heart J.** p 38, n 23, p1843–1850. 2017.

MADAMANCHI, NR.; VENDROV, A.; RUNGE, MS.; Oxidative stress and vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v 25, p29-38. 2005.

MARROQUIN, TY.; GUAUQUE-OLARTE, S. Integrative analysis of gene and protein expression in atherosclerosis-related pathways modulated by periodontal pathogens. Systematic review. **Jpn Dent Sci Rev.** v 59, p8-22, dec. 2023.

MASON, RP.; WALTER, MF.; MCNULTY, HP.; et al. Rofecoxib increases susceptibility of human LDL and membrane lipids to oxidative damage: a mechanism of cardiotoxicity. **J Cardiovasc Pharmacol.** v 47, n 1, p7-14, 2006.

MATTILA, KJ.; VALTONEN, VV.; NIEMINEN, M.; et al. Dental infection and the risk of new coronary events: prospective study of patients with documented coronary artery disease. **Clin Infect Dis.** v 20, n 3, p588-92, mar.1995.

MELO, MMDC.; FRAZÃO P.; JAMELLI S. Saúde bucal e doenças crônicas não transmissíveis: determinantes e fatores de risco que exigem ação articulada no contexto de construção do sistema de vigilância à saúde. In: Eduardo Freese. (Org.). Epidemiologia, políticas e determinantes das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil. Recife: **Universitária/UFPE**; p.231-66. 2006.

MENAKA, KB.; RAMESH, A.; THOMAS, B. et al. Estimation of nitric oxide as an inflammatory marker in periodontitis. **J Indian Soc Periodontol.** v 13, n 2, p75-78, May. 2009.

MENDES RT. Cardiovascular Effects of the Cyclooxygenase-2 Inhibition in an Experimental Model of Periodontitis in Rats, 2012. Dissertação (Mestrado em Clínica Integrada, Dentística Restauradora e Periodontia- **Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa**, 2012.

MENDES, RT.; SORDI, R.; OLCANHESKI, LR Jr.; et al. Periodontitis increases vascular cyclooxygenase-2: potential effect on vascular tone. **J Periodontal Res.** v 49, n 1, p85-92, Feb. 2014.

MENDES, RT.; STANCZYK, CP.; SORDI, R.; et al. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. **Rev Bras Reumatol.** v 52, n 5, p774–82, sep. 2012.

MENDONÇA, DD.; FURTADO, MV., SARMENTO,A, et al. Periodontitis and tooth loss have negative impact on dietary intake: A cross-sectional study with stable coronary artery disease patients. **Journal of periodontology**, v 90, n 10, p1096–1105. 2019.

MEYLE, J.; CHAPPLE, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. **Periodontol 2000.**v 69, n 1, p7-17, oct. 2015.

MIYAMOTO, Y.; KOH, YH.; PARK, YS.; et al. Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. **Biol Chem.** v 384, n 4, p567-74, 2003.

MOORE, N. Riscos coronarianos associados ao diclofenaco e outros AINEs: uma atualização. **Droga Seg.** v 43, n 4, p301–318. 2020.

MORO, MG,; OLIVEIRA, MDS.; OLIVEIRA, LR.; et al. Efeitos da inibição seletiva versus não seletiva da COX-2 na periodontite experimental. **Revista Brasileira de Odontologia.** V 30, n 2, p133–138. 2019.

MORRISON, HI.; ELLISON, LF.; TAYLOR, GW. Periodontal disease and risk of fatal coronary heart and cerebrovascular diseases. **J Cardiovasc Risk.** v 6, n 1, p7-11, fev. 1999.

MORTON, RS.; DONGARI-BAGTZOGLU, AI. Cyclooxygenase-2 is upregulated in inflamed gingival tissues. **J.Periodontol.** Chicago, v 72, n 4, p.461-469, Apr. 2001.

MUSCARÁ, MN.; VERGNOLLE et al. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition with celecoxib elevates blood pressure and promotes leukocyte adherence. **Br J Pharmacol.** v 129, n 7, p1423-30. 2000.

NEVES, JA.; NEVES, JA.; OLIVEIRA, RCM. Biomarcadores de função endotelial em doenças cardiovasculares: hipertensão. **J Vasc Bras.** v 15, n 3, p224-233, Jul-Sep. 2016.

NISSEN, SE.; YEOMANS, ND.; SOLOMON, DH.; & PRECISION Trial Investigators. Cardiovascular Safety of Celecoxib, Naproxen, or Ibuprofen for Arthritis. **The New England journal of medicine**, v 375, n 26, p 2519–2529. 2016.

NIU, J.; AZFER, A.; DEUCHER, MF.; et al. Targeted cardiac expression of soluble Fas prevents the development of heart failure in mice with cardiac-specific expression of MCP-1. **J Mol Cell Cardiol**. v 40, n 6, p810-20. Jun. 2006.

NGUYEN, CM.; KIM, JW.; QUAN, VH.; et al. Periodontal associations in cardiovascular diseases: The latest evidence and understanding. **J Oral Biol Craniofac Res**. v 5, n 3, p203-6, Sep-Dec. 2015.

OH, BC.; LOPES, AL.; MACEDO, RCO.; et al. Inflammatory markers, endothelial function and cardiovascular risk. **Jornal Vascular Brasileiro**. v 13, n 2, p108–115, abr. 2014.

OH, CK.; AHMED, MSF.; XIE, C.; et al. Microarray Analysis of NSAIDs-treated Cardiomyocytes to Search for Genes Involved in COX-2 Inhibitor Cardiotoxicity. **Genet. Mol. Res**. v 17, n 4, p18068, 2018.

OLCHANHESKI, LR. JR.;, SORDI, R.; OLIVEIRA, JG.; et al. The role of potassium channels in the endothelial dysfunction induced by periodontitis. **J Appl Oral Sci**. v 4, n 26, Oct. 2018.

ORLYVARDENY, P.; SCOTT, D.; SOLOMON, MD.; Cyclooxygenase-2 inhibitors, nonsteroidal anti – inflammatory drugs, and cardiovascular risk. **Cardiology Clinics**. v 26, p589- 601, 2008.

PACHER, P.; BECKMAN, JS.; LIAUDET, LJPR. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**. v 87, n 1, p315-424, 2007.

PARK, JY.; PILLINGER, MH.; ABRAMSON, SB.; Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE₂ synthases. **Clin Immunol**. v 119, n 3, p229-40, jun. 2006.

PATIL, VA.; DESAI, MH. Effect of Periodontal Therapy on Serum C-Reactive Protein Levels in Patients with Gingivitis and Chronic Periodontitis: A Clinicobiochemical Study. **Journal of Contemporary Dental Practice**. v 14, n 2, p233-237, March-April. 2013.

PRIYAMVARA, A.; DEY, AK.; BANDYOPADHYAY, D.; et al. Periodontal Inflammation and the Risk of Cardiovascular Disease. **Curr Atheroscler. Rep**. v 8, n 7, p22-28, Jun. 2020.

QUEIROZ-JUNIOR, CM.; PACHECO, CMF.; MALTOS, KLM.; 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. **J Periodont Res.** v 44, p153-60. 2009.

RAMOM GC. Atividade imuno-inflamatória no reparo tecidual da lesão cardíaca induzida por isoproterenol em ratos: Implicações e oportunidades terapêuticas. **Universidade Federal de Santa Catarina**, Florianópolis, 2011.

REHER, VG.; ZENÓBIO, EG.; COSTA, FO.; et al. Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis. **J Oral Sci.** v 49, n 4, p271- 276, Dec. 2007.

RESOLUÇÃO-RDC79, de 4 de novembro de 2008. **Diário Oficial da União** de 05/11/08. N.215 seção1. 2008.

RIBEIRO, AB.; DA SILVA, TM.; SANTOS-JÚNIOR NN., et al. Short-term effect of ligature-induced periodontitis on cardiovascular variability and inflammatory response in spontaneously hypertensive rats. **BMC Oral Health.** v 21, n 10, p515. Oct. 2021.

RONA, G.; CHAPPEL, CI.; BALAZS, T.; et al. An infarct-like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. **AMA Arch Pathol.** v 67, n 4, p99-111, Apr. 1959.

SALVO, F.; ANTONIAZZI, S.; DUONG, M.; et al. Eventos cardiovasculares associados ao uso prolongado de AINEs: uma revisão de ensaios clínicos randomizados e estudos observacionais. **Expert Opinion on Drug Safety.** v 13, n 5, p573–585. 2016.

SANDOVAL, AC.; FERNANDES, DR.; SILVA, EA.; et al. O uso indiscriminado dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente.** v 8, n 2, p165-176, jul./dez. 2017.

SANZ, M.; DEL CASTILLO, AM.; JEPSEN, S.; et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. **J Clin Periodontol.** v 47, n 3, p268-288, Mar. 2020.

SAXENA, AK.; RAMACHANDRAN, R.; GULATI, M.; et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors in post operative pain and chronic pain management: Current opinions and future perspectives. **Indian J Anesthes.** v 49, n 3 ,p170–179. 2005.

SCHÄTZLE, M.; LÖE, H.; BÜRGIN, W.; et al. Clinical course of chronic periodontitis. I. Role of gingivitis. **J Clin Periodontol.**v 30, n 10, p887-901, Oct. 2003.

SECRETARIA DE ATENÇÃO PRIMÁRIA A SAÚDE (SAPS). **SB Brasil 2020.** Disponível em: <<https://aps.saude.gov.br/ape/brasilsorridente/sbbrasil2020>>. Acesso em jun. de 2023.

SHEVCHENKO, YL.; PLOTNITSKY, AV.; ULBASHEV, DS.; Immobilizing Interstitial Cardiac Fibrosis. **Cardiology research**. v 14, n 2, p123–132. 2023.

SEMERARO, F.; RUSSO ,A.; GAMBICORTI, E.; et al. Efficacy and vitreous levels of topical NSAIDs. **Expert Opin Drug Deliv**. v 12, n 11, p1767-82, 2015.

SILVERSTEIN, FE.; FAICH, G.; GOLDSTEIN, JL.; et al. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. **JAMA**. v 284, n 10, p1247-55, sep. 2000.

SIMÃO, AF.; PRECOME, DB.; ANDRADE et al. I Diretriz brasileira de prevenção cardiovascular. **Revista da Sociedade Brasileira de Cardiologia**. v 101, n 6, p1–63. 2013.

SINGH, G.; RAMEY, DR.; MORFELD, D.; et al. Gastrointestinal tract complications of nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment in rheumatoid arthritis. **Arch Intern Med**. v 156, p1530-6, 1996.

SIQUEIRA, JF.; DANTAS, CJS. **Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação**. 1. Ed. *Rio de Janeiro; Medsi*, 2000.

SMELTZER, SC.; BARE, BG. Histórico da função cardiovascular. In: Smeltzer SC, Bare BG.; et al: Tratado de enfermagem médico-cirúrgica. 10. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**p. 682-700; 2009.

STEFFENS, JP.; SANTOS, FA.; PILATTI, GL. The use of etoricoxib and celecoxib for pain prevention after periodontal surgery: a double-masked, parallel-group, placebo-controlled, randomized clinical trial. **J Periodontol**. v 82, n 9, p1238-44, sep. 2011.

STRUILLLOU, X.; BOUTIGNY, H.; SOUEIDA, A.; et al. Experimental Animal Models in Periodontology:A Review. **The Open Dentistry Journal**. v 4, p37-47. 2010.

TANG EH, VANHOUTTE PM. Prostanoids and reactive oxygen species: team players in endothelium-dependent contractions. **Pharmacol Ther**.v 122, n 2, p140-9, 2009.

TOMOFUJI, T.; EKUNI, D.; IRIE, K.; et al. Relationships between periodontal inflammation, lipid peroxide and oxidative damage of multiple organs in rats. *Biomed Res*. v 32, n 5, p343-9, Oct, 2011.

TONETTI, MS.; CHAPPLE, ILC.; JEPSEN, S.; et al. Primary and secondary prevention of periodontal and peri-implant diseases – Introduction to, and objectives of the 11th European Workshop on Periodontology consensus conference. **J Clin Periodontal**, v.42, supl.16, p.S1-S4, 2015.

TRELLE, S.; REICHENBACH, S.; WANDEL, S.; et al. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. **BMJ**. v 11, p 342. Jan. 2011.

TSIOUFIS, C.; KASIAKOGIAS, A; THOMOPOULOS, C.; Periodontitis and blood pressure:the concept of dental hypertension. **Atherosclerosis**. v 219, n 1, p1- 9. Nov. 2011.

VAITHIANATHAN, R.; HOCKEY, PM.; MOORE, TJ.; et al. Iatrogenic effects of COX-2 inhibitors in the US population: findings from the Medical Expenditure Panel Survey. **Drug Saf**. v 32, n 4, p335-43, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**,. v 39, n 1, p44–84. 2007.

WAJCHENBERG, BL. Disfunção endotelial no diabetes do tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. v 46, p514-519, 2002.

WANG, Y.; HUANG, X.; HE, F. Mechanism and role of nitric oxide signaling in periodontitis. **Exp Ther Med**. v 18, n 5, p3929-3935, Nov. 2019.

WOLF, TG.; CAGETTI, MG.; FISHER, JM.; et al. Non-communicable Diseases and Oral Health: An Overview. **Front Oral Health**. v 3, n 2, p725-460, Sep. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cardiovascular diseases**. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Acesso em fev. de 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030**. Geneva: World Health Organization; Licence: CC BY-NC-SA3.0IGO. 2022.

WU, T.; TREVISAN, M.; GENCO, RJ.; et al. Periodontal disease and risk of cerebrovascular disease: the First National Health and Nutrition Examination Survey and its follow-up study. **Arch Intern Med**. v 9, n 160, p2749-55, Oct. 2000.

WU, X.; WEI, M.; ZHANG, H.; et al. The Protective Effect of Aspirin against Myocardial Hypertrophy in Rats. **Biomed Res Int**. v 20, p2043415. Apr. 2021.

YUGAR-TOLEDO, JC.; Yugar, LBT, Tácito, LHB.; et al. Disfunção Endotelial e Hipertensão Arterial. **Rev Bras Hipertens**. v 22, n 3, p84-92, 2015.

ANEXO 1 – PARECER DE APROVAÇÃO DA COSSIMÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Nº 1329

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.082142/2019-27

APROVADO/APPROVAL: 10/12/2019 – R.O. 11/2019

TÍTULO: Efeito de um inibidor seletivo para COX-2 sobre o infarto miocárdico induzido por isoprenalina em ratos com periodontite.

TITLE: Effect of a selective COX-2 inhibitor on the myocardial infarct induced by isoprenaline in rats with periodontitis.

AUTORES/AUTHORS: Reila Tainá Mendes, Humberto Osvaldo Schwartz Filho, Michel Fleith Ouki, Daniel Fernandes, Regina de Sordi, Mariana Oliveira, Alana Gabrielli Vosk, Mayra Fanderuff.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Estomatologia

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, MEDICO VETERINARIO**, em 06/01/2020, às 16:23, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **KATYA NALIWAIKO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 30/09/2020, às 20:48, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida www.ufpr.br/ceua informando o código verificador 2410286 e o código CRC CBEEE78B.

Relato:

Processo: 23075.082142/2019-27

Título: Efeito de um inibidor seletivo para COX-2 sobre o infarto miocárdico induzido por isoprenalina em ratos com periodontite

Responsável: Profa. Dra. Reila Tainá Mendes (Departamento de Estomatologia)

Assunto: Prorrogação do prazo para a execução da pesquisa até 31/12/2023.

Justificativa: Em virtude da pandemia da COVID-19, o cronograma inicial (10/12/2019 até 31/12/2021) foi prejudicado.

Documento apresentado: Carta de solicitação de prorrogação de prazo (documento SEI 3894604).

Parecer:

Considerando que o projeto permanece igual ao que havia sido aprovado em 10/12/2019 pela CEUA (certificado 1329), e que de fato o cronograma inicial de execução coincidiu com o pico da pandemia da COVID-19, sou de parecer FAVORÁVEL à prorrogação do prazo conforme solicitado.

Novo período de vigência do projeto: até 31/12/2023.

Relator(a): Prof. Thales Ricardo Cipriani
Reunião CEUA 19/10/21