

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
MARIANA OLIVEIRA

EFEITO DA INIBIÇÃO SELETIVA DA COX-2 SOBRE TECIDO  
CARDÍACO APÓS INFARTO MIOCÁRDICO EM RATOS COM  
PERIODONTITE EXPERIMENTAL

CURITIBA

2022

MARIANA OLIVEIRA

EFEITO DA INIBIÇÃO SELETIVA DA COX-2 SOBRE  
TECIDOCARDÍACO APÓS INFARTO MIOCÁRDICO EM RATOS COM  
PERIODONTITE EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da  
Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Osvaldo  
Schwartz-Filho.

Coorientadora: Prof. Dr. Reila Tainá  
Mendes

CURITIBA

2022

Oliveira, Mariana

Efeito da inibição seletiva da COX-2 sobre tecido cardíaco após infarto miocárdico em ratos com periodontite experimental [recurso eletrônico] / Mariana Oliveira - Curitiba, 2022.

1 recurso online: PDF.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Osvaldo Schwartz-Filho

Coorientador: Prof. Dr. Reila Tainá Mendes

1. Periodontite. 2. Isoprenalina. 3. Doenças cardiovasculares. I. Schwartz-Filho, Humberto Osvaldo. II. Mendes, Reila Tainá. III. Universidade Federal do Paraná.

IV. Título.

CDD 617.632

**ATA Nº153**

## **ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM ODONTOLOGIA**

No dia dez de março de dois mil e vinte e dois às 14:00 horas, na sala Microsoft Teams, Microsoft Teams, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestrand **MARIANA OLIVEIRA**, intitulada: **EFEITO DA INIBIÇÃO SELETIVA DA COX-2 SOBRE TECIDO CARDÍACO APÓS INFARTO MIOCÁRDICO EM RATOS COM PERIODONTITE EXPERIMENTAL**, sob orientação do Prof. Dr. HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ODONTOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), KARINA KOGO MULLER (55002867), CAIO VINICIUS GONÇALVES ROMAN TORRES (UNIVERSIDADE SANTO AMARO). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 10 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica

15/03/2022 14:00:39.0

HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

25/03/2022 10:28:13.0

KARINA KOGO MULLER

Avaliador Externo (55002867)

Assinatura Eletrônica

16/03/2022 18:58:44.0

CAIO VINICIUS GONÇALVES ROMAN TORRES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE SANTO AMARO)

## 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 **MARIANA OLIVEIRA** intitulada: **EFEITO DA INIBIÇÃO SELETIVA DA COX-2 SOBRE TECIDO CARDÍACO APÓS INFARTO MIOCÁRDICO EM RATOS COM PERIODONTITE EXPERIMENTAL**, sob orientação do Prof. Dr. HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO, 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 à 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, 10 de Março de 2022.

Assinatura Eletrônica

15/03/2022 14:00:39.0

HUMBERTO OSVALDO SCHWARTZ FILHO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

25/03/2022 10:28:13.0

KARINA KOGO MULLER

Avaliador Externo (55002867)

Assinatura Eletrônica

16/03/2022 18:58:44.0

CAIO VINICIUS GONÇALVES ROMAN TORRES

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE SANTO AMARO)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a vida e me proporcionado saúde e força para superar todas as dificuldades.

Aos meus orientadores, Humberto Osvaldo Schwartz-Filho e Reila Tainá Mendes, pelos ensinamentos, pela paciência e pela oportunidade de aprender com vocês. Mentores que levarei para o resto da vida.

Aos meus pais, Miriane e Roberval, por terem me proporcionado uma boa educação, sempre me apoiando e me incentivando com muito amor e dedicação.

À minha irmã Carolina, com quem compartilho os momentos mais felizes da vida e que sempre me incentiva em busca dos meus sonhos.

Ao meu namorado Jorge, pelo amor, companheirismo e apoio ofertado todos os dias.

Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado, me incentivando independentemente da situação. Tornando essa caminhada mais leve e repleta de boas histórias. Em especial, Marcelo Yudi Sakamoto, que não mediu esforços em sempre estar ao meu lado, obrigada por toda a ajuda.

Aos alunos, Nelson Macedo e Alana Vouk, que colaboraram muito para o andamento da pesquisa, com muito carinho e dedicação.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia UFPR, em especial, Bruna Colombo que me proporcionou muitos ensinamentos e acolhimento.

Ao Professor Jayme Bordini Jr., pelos conhecimentos compartilhados e paciência ao ensinar.

À esta Universidade, seu corpo docente, direção e administração, que formaram a base sólida que moldou meu futuro profissional.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, obrigada!

## RESUMO

A Periodontite pode ser definida como uma doença inflamatória, crônica, multifatorial associada ao biofilme disbiótico e caracterizada pela destruição do aparato de inserção dental. A microbiota e a resposta do hospedeiro presentes na doença periodontal induzem inflamação sistêmica e conseqüentemente uma redução na produção de óxido nítrico, o que gera disfunção endotelial que por sua vez está intimamente associada a doenças cardiovasculares. O aumento na expressão vascular da ciclooxygenase-2 (COX-2) é observado em patologias que apresentam disfunção endotelial e está relacionada com a produção de prostaciclina, um derivado do ácido araquidônico com propriedades vasodilatadoras e antitrombóticas. Sugere-se que a indução da COX-2 em células endoteliais possa contrabalancear a redução na produção de óxido nítrico. Portanto, a inibição da COX-2 na presença de periodontite pode apresentar riscos de complicações cardiovasculares. Com isto, a proposta deste trabalho é avaliar o efeito do tratamento com um inibidor seletivo da COX-2, o etoricoxibe, sobre o tecido cardíaco em ratos com periodontite. No dia zero, 42 ratos Wistar (machos) foram submetidos ao procedimento de colocação de ligadura para indução da periodontite ou falsa cirurgia (a ligadura foi posicionada e imediatamente removida). Quatorze dias após o procedimento, os ratos foram separados randomicamente em 4 grupos experimentais: ligadura+etoricoxibe, ligadura+veículo, sham+etoricoxibe e sham+veículo. Esses animais receberam tratamento com inibidor seletivo da COX-2 ou veículo (água destilada) durante sete dias. Nos dias dezoito e vinte, os animais receberam uma injeção de isoprenalina para indução de isquemia cardíaca. Após vinte e um dias da colocação das ligaduras ou falsa cirurgia, os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica e os corações foram retirados para análises histológicas. A mandíbula e a maxila foram dissecadas para avaliação morfométrica da perda óssea alveolar. Todos os grupos experimentais apresentaram alterações histológicas após isquemia cardíaca induzida pela isoprenalina, porém o grupo ligadura que recebeu etoricoxibe apresentou a maior quantidade de infiltrado inflamatório e fibras colagênicas. Sugere-se que a inibição da COX-2 em um modelo experimental de periodontite pode exacerbar alterações cardiovasculares.

Palavras-chaves: Periodontite; ciclooxygenase-2; doenças cardiovasculares

## ABSTRACT

Periodontitis can be defined as an inflammatory, chronic, multifactorial disease associated with dysbiotic biofilm and characterized by the destruction of the dental attachment apparatus. The microbiota and the host response present in periodontal disease induce systemic inflammation and consequently are reduction in the production of nitric oxide, which generates endothelial dysfunction which in turn is closely associated with cardiovascular diseases. The increase in vascular expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) is observed in pathologies that present endothelial dysfunction and is related to the production of prostacyclin, an arachidonic acid derivative with vasodilating and antithrombotic properties. It is suggested that COX-2 induction in endothelial cells may counter balance the reduction in nitric oxide production. Therefore, COX-2 inhibition in the presence of periodontitis may pose risks of cardiovascular complications. Thus, the purpose of this work is to evaluate the effect of treatment with a selective COX-2 inhibitor, etoricoxib, on cardiac tissue in rats with periodontitis. On day zero, 42 male Wistar rats were submitted to the ligature placement procedure for periodontitis induction or sham surgery (the ligature was positioned and immediately removed). Fourteen days after the procedure, the rats were randomly divided into 4 experimental groups: ligation+etoricoxib, ligation+vehicle, sham+etoricoxib and sham+vehicle. These animals received treatment with a selective COX-2 inhibitor or vehicle (distilled water) for seven days. On days nine, ten and twenty, the animals received an injection of isoprenaline to induce cardiac ischemia. Twenty-one days after the ligature placement or sham surgery, the animals were euthanized with anesthetic overdose and the hearts were removed for histological analysis. The mandible and maxilla were dissected for morphometric evaluation of alveolar bone loss. All experimental groups showed histological changes after isoprenaline-induced cardiac ischemia, but the ligation group that received etoricoxib had the highest amount of inflammatory infiltrate and collagen fibers. It is suggested that COX-2 inhibition in an experimental model of periodontitis may exacerbate cardiovascular changes.

Keywords: Periodontitis; cyclooxygenase-2; cardiovascular diseases.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Produção dos prostanóides (tromboxanos e prostaglandinas) a partir do metabolismo do ácido aracdônico.

FIGURA 2 - Efeitos vasculares da prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e do Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>).

FIGURA 3 - Colocação das ligaduras nos ratos.

FIGURA 4 - Mandíbula e Maxila, respectivamente, com suas respectivas medidas lineares para mensurar a perda óssea alveolar média (mm).

FIGURA 5 - Foto do coração fixado em solução LFAC.

FIGURA 6 - Representação cronológica do protocolo experimental do estudo.

FIGURA 7 - Diâmetro dos cardiomiócitos utilizando o programa VS VIEWER.

FIGURA 8 - Efeito do etoricoxibe sobre o tecido cardíaco infartados com doses subcutâneas de Isoprenalina em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa cirurgia. Coloração Hematoxilina e Eosina.

FIGURA 9 - Efeito do etoricoxibe sobre o tecido cardíaco infartados com doses subcutâneas de Isoprenalina em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa cirurgia. Coloração Tricrômio de Mallory.

## **LISTA DE GRÁFICOS**

GRÁFICO 1- Representação gráfica da perda óssea alveolar média (mm) em um modelo experimental de periodontite com inibição de COX-2.

GRÁFICO 2- Percentual de fibras colágenas presentes nos cortes histológicos do ventrículo esquerdo dos animais.

GRÁFICO 3- Representação média do diâmetro dos cardiomiócitos( $\mu\text{m}$ ) através da análise dos cortes histológicos do ventrículo esquerdo dos animais.

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1: Coxibes, sua data de aprovação e retirada do mercado

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS Organização Mundial da Saúde

COX-2 Ciclooxigenase-2

COX-1 Ciclooxigenase-1

PGE2 Prostaglandina

E2PGE1 ProstaglandinaE1

DCVs Doenças cardiovasculares

MMPs Metaloproteinases de matriz

TNF Fator de necrose tumoral

PCR Proteína C-reativa

LPS Lipopolissacarídeos

ICAM Molécula de adesão intercelular

ERO Espécies reativas de oxigênio

PGI2 Prostaciclina

iNOS Óxido nítrico sintase induzidase

AA Ácido aracdônico

PGG2 Prostaglandina

G2PGH2 ProstaglandinaH2

FDA Food and DrugAdministration

VIGOR Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research

CLASS Celecoxib Longterm Arthritis Safety Study

APPROV Adenomatous Polyp Preventionon

EMA Agência Europeia do Medicamento

TXA2 TromboxanoA2

AAS Ácidoacetilsalicílico

AVC Acidente cardiovascular cerebral

IL-1 Interleucina-1

IL-6 InterleucINA-6

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. OBJETIVOS GERAIS</b> .....	16
<b>3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	16
<b>4. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
4.1 DOENÇA PERIODONTAL .....	17
4.2 RELAÇÃO DOENÇA PERIODONTAL E DOENÇAS CARDIOVASCULARES ...	17
4.3 DOENÇA PERIODONTAL E A FUNÇÃO ENDOTELIAL .....	20
4.4 CICLOOXIGENASES .....	21
4.5 INIBIÇÃO SELETIVA DA COX-2.....	23
4.6 COMPLICAÇÕES CARDIOVASCULARES RELATIVAS A INIBIÇÃO DAS CICLOOXIGENASES .....	25
<b>5- MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
5.1 AMOSTRA.....	27
5.2 INDUÇÃO DA PERIODONTITE ATRAVÉS DE LIGADURAS.....	27
5.3- ADMINISTRAÇÃO DA MEDICAÇÃO .....	28
5.4-LESÃO DE ISQUEMIA CARDÍACA INDUZIDA POR ISOPRENALINA .....	29
5.5- PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	29
5.6- AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA PERDA ÓSSEA.....	30
5.7- ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO CARDÍACO .....	32
5.8- COMPONENTES E REAGENTES UTILIZADOS .....	34
<b>6- RESULTADOS</b> .....	34
6.1- PERDA ÓSSEA ALVEOLAR MÉDIA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO DE COX-2.....	34
6.2- HISTÓLOGIA CARDÍACA DOS RATOS SUBMETIDOS A LESÃO DE ISQUEMIA CARDÍACA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO DE COX-2: AVALIAÇÃO DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO .....	35

6.2.1- Histologia cardíaca dos ratos submetidos a lesão de isquemia cardíaca em um modelo experimental de periodontite com inibição de COX-2: avaliação de infiltrado inflamatório: quantificação de fibras colágenas. ....	36
6.2.2- Diâmetro dos Cardiomiócitos .....	38
<b>7- DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>8- CONCLUSÕES</b> .....	<b>43</b>
<b>9- REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença Periodontal é uma doença inflamatória crônica associada ao acúmulo de biofilme patogênico supra e subgengival, capaz de promover disbiose microbiana e,consequentemente, desencadear uma resposta inflamatória crônica exacerbada e quando não tratada, pode levar à destruição dos tecidos de suporte dentário (Jepsen et al. 2017). É uma doença de impacto global, sendo considerada a 6ª mais comum no mundo (Kassembaum et al. 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no Brasil a prevalência da forma moderada da doença em adultos é de 15,3% e a forma mais grave de 5,8%.

O conceito de infecção focal é utilizado para elucidar a capacidade de disseminação de microorganismos patogênicos da cavidade oral, para várias localizações do corpo, com influência na saúde sistêmica (Masthan,Anitha,Jacobina& Babu 2016). Uma vez que as doenças periodontais estão entre as infecções crônicas mais prevalentes no ser humano, o interesse científico sobre a patologia e seus efeitos tem aumentado (Sanz,D'Ajuto,Deanfield& Fernandez-Aviles 2010).

Atualmente estudos suportam uma relação causal entre doença periodontal e doenças cardíacas, como aterosclerose e hipertensão, demonstrando o risco aumentado de desenvolvimento de complicações cardiovasculares em pacientes com problemas periodontais (Janket et al. 2003; Sfyroeras et al. 2012). Embora não sejam claros os mecanismos pelos quais estas condições estejam associadas, acredita-se que a inflamação sistêmica gerada pela microbiota presente na periodontite possa contribuir para o desenvolvimento de disfunção endotelial (Ekuni et al.2009), que é um fator predisponente para doenças cardiovasculares.

Um aumento na expressão vascular de Ciclooxygenase-2 (COX-2) é observado em patologias que apresentam disfunção endotelial (Foudi et al. 2009). As ciclooxigenases são enzimas existentes em duas formas distintas, COX-1 e COX-2, e são responsáveis pela síntese de prostanóides, que são importantes mediadores inflamatórios, dentre estes destacam-se a prostaglandina E2 (PGE2) e a prostaglandina E1 (PGE1) considerados potentes vasodilatadores (William e Peck 1977). Além disso, a expressão de COX-2 em células endoteliais também representa uma importante contribuição para produção de prostaciclina, um derivado do ácido araquidônico com propriedades vasodilatadoras e antitrombóticas (Foudi et al. 2009).

Desta forma, sugere-se que a indução da COX-2 em células endoteliais pode contra balancear a redução na produção de óxido nítrico, que apresenta papel importante na homeostase vascular. Se por um lado, a inibição da COX-2, bloqueia o processo inflamatório, por outro pode apresentar aspectos cardiovasculares deletérios. Os fármacos inibidores seletivos para COX-2, como o Etoricoxibe, são uma opção terapêutica para controle de dor e inflamação para pacientes submetidos a procedimentos periodontais (Steffens et al.2010; Gerzson 2021). Entretanto o efeito destes fármacos sobre variáveis cardiovasculares em pacientes com periodontite tem sido negligenciado. Assim, a proposta deste trabalho é compreender a relação da doença periodontal e inibidores seletivos de COX-2 com o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, utilizando um modelo experimental de periodontite em ratos.

## **2. OBJETIVOS GERAIS**

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

## **3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o infiltrado inflamatório com coloração de Hematoxilina e Eosina em corações de ratos com periodontite submetidos a isquemia cardíaca, induzida por isoprenalina, e a inibição da COX-2.
- Avaliar diâmetro dos cardiomiócitos dos corações de ratos com periodontite os submetidos a isquemia cardíaca, induzida por isoprenalina, e a inibição da COX-2.
- Avaliar presença de fibras colágenas com coloração de Tricrômico de Mallory em corações de ratos com periodontite submetidos a isquemia cardíaca, induzida por isoprenalina, e a inibição da COX-2.
- 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.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 DOENÇA PERIODONTAL

A Doença Periodontal (DP) é uma doença inflamatória crônica associada ao acúmulo de biofilme patogênico supra e subgingival, capaz de promover disbiose microbiana e, conseqüentemente, desencadear uma resposta inflamatória crônica exacerbada (Jepsen et al. 2017). A doença inicia-se com inflamação dos tecidos de proteção dental, condição chamada gengivite. Se não tratada, a inflamação pode evoluir e atingir os tecidos de suporte dentário, o que caracteriza a periodontite. É marcada pela presença de sangramento, edema e aumento do fluido crevicular, resultantes da atividade inflamatória, mediada por bactérias ou endotoxinas, e da resposta imunológica do hospedeiro, induzida principalmente por neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos T e B (Lira-Junior e Figueredo 2016).

A periodontite está relacionada principalmente com microorganismos anaeróbicos gram-negativos que colonizam a área subgingival, esta placa bacteriana subgingival abriga mais de 500 espécies bacterianas, sendo a *Porphyromonasgingivalis* apresentada pelos estudos como o principal agente etiológico associado à periodontite crônica (Howetal.2015) . Adicionalmente ao biofilme determinante da DP, diversos fatores aumentam a possibilidade do desenvolvimento dessa doença, destacando entre eles o gênero, idade, exposição ambiental, hábitos pessoais, além também, dos fatores genéticos e sistêmicos (Eke et al. 2015).

Estudos têm demonstrado que a inflamação decorrente da periodontite tem repercussões sistêmicas e está associada ao risco aumentado para as doenças cardiovasculares, dentre elas aterosclerose, acidente cardiovascular cerebral (AVC) e infarto agudo do miocárdio (Holmlund et al. 2017; Lima et al. 2020; Batista et al. 2011). Desta forma, foi observado que há uma conexão entre a saúde bucal e a saúde sistêmica.

### 4.2 RELAÇÃO DOENÇA PERIODONTAL E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Entre as doenças sistêmicas mais associadas à doença periodontal estão as

doenças cardiovasculares (Ionel et al. 2016). As doenças cardiovasculares (DCVs) têm papel indiscutível na morbidade e mortalidade, tanto nos países desenvolvidos como nos em desenvolvimento. Em um estudo realizado pela Organização Mundial de Saúde em 2011, estimou-se que em 2030 aproximadamente 23,6 milhões de pessoas, provavelmente, morrerão de doenças cardiovasculares (Mendis, Puska, Norrving 2011). A correlação entre doenças cardiovasculares e as doenças periodontais já foi estabelecida. No entanto, é necessária uma investigação aprofundada para compreender melhor a associação entre doença periodontal e doenças cardiovasculares.

Um dos possíveis mecanismos pelo qual a periodontite se relaciona a complicações cardiovasculares seria através dos periodontopatógenos, as bactérias, *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e a *T. forsythia*, são consideradas como periodonto patógenos clássicos (Haffajee e Socransky 2005). O aumento do número dessas bactérias na cavidade oral provoca uma resposta inflamatória e 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). Segundo Hajishengallis 2015, os patógenos periodontais e os mediadores inflamatórios podem entrar na corrente sanguínea e se disseminarem, exercendo um impacto na inflamação sistêmica. Adicionalmente, a ulceração epitelial nas bolsas periodontais possibilita a translocação bacteriana para a circulação sistêmica (Figueredo et al. 2016).

O caráter inflamatório crônico e as bactérias patogênicas do periodonto, são responsáveis pela ativação de resposta imuno inflamatória, o que pode favorecer a formação e maturação das placas de ateroma, e desencadear a instalação da doença cardiovascular (Kaschwich et al. 2019). Almeida et al em 2017, observaram a presença de bactérias orais em lesões ateroscleróticas em pacientes com periodontite sugerindo que as bactérias, ou seus componentes antigênicos, induzem alterações no endotélio associadas à aterosclerose.

As citocinas pró-inflamatórias produzidas localmente também podem entrar na circulação sanguínea e induzir uma resposta de fase aguda ao fígado, promovendo a aterogênese (Hajishengallis et al. 2015). Um dos fatores mais importantes para a progressão da lesão aterosclerótica é a liberação de lipopolissacarídeo (LPS) na

corrente sanguínea, a presença desta endotoxina na circulação desencadeia uma cascata metabólica, induzindo a produção de PGE2, TNF-1, IL-1 que, conseqüentemente, resulta na destabilização das placas ateroscleróticas e proliferação de células musculares lisas nas artérias (Kulińska-Michalska&Lewkowicz 2017). As metaloproteinases de matriz (MMPs) também são liberadas na presença de LPS e estão associadas à ruptura das placas ateroscleróticas, tornando-se essenciais para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Chistiakov et al, 2016).

Outros fatores também citados na literatura e que contribuem significativamente para a ocorrência de doenças cardiovasculares, são os níveis elevados de fibrinogênio plasmático e de proteína C reativa (Mehta et al. 2001). A proteína C reativa é produzida pelos hepatócitos como uma resposta do organismo frente a inflamações ou infecções e atua promovendo a fagocitose de micro-organismos e células em processo de apoptose através da ativação dos monócitos/macrófagos além de aumentar consideravelmente a síntese e secreção de IL-1, IL-6 e TNF. Além disso, vem sendo largamente abordada por representar um marcador inflamatório muito utilizado por cardiologistas na avaliação do risco de eventos ateroscleróticos (Lima et al. 2002; Hirschfield et al. 2003). Em estudo proposto por Arregoces e colaboradores em 2014, foram avaliados 401 indivíduos, com idade entre 30 e 75 anos, para avaliar a relação entre doença periodontal e pacientes com e sem infarto do miocárdio e, verificaram que os níveis de PCR são aumentados em pacientes que possuem periodontopatias. Corroborando com esses resultados, Chandy et al. (2017) e Bolla et al. (2017) também relataram em seus trabalhos maiores concentrações séricas de PCR nos pacientes com periodontite quando comparados aos indivíduos com periodonto saudável.

Os níveis de fator de necrose tumoral  $\alpha$  sérica (TNF- $\alpha$ ) também são descritos como significativamente altos em pacientes com periodontite. E está presente no estágio inicial da aterosclerose e desempenha papel importante na expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM), produção de IL-6, redução da produção de síntese de óxido nítrico endotelial (Skoog *et al.* 2002).

Segundo Kebschull et al. (2010), um caminho potencial através do qual a periodontite pode contribuir para a aterogênese é a indução de estresse oxidativo. Respostas inflamatórias geram espécies oxigênio reativas e para o colesterol ser absorvido por macrófagos e formar células de espuma é necessário a oxidação do LDL por espécies reativas de oxigênio (ERO). Assim, além do envolvimento na

formação de estrias gordurosas, a oxidação do LDL pode afetar o endotélio vascular, tanto direta como indiretamente.

#### 4.3 DOENÇA PERIODONTAL E A FUNÇÃO ENDOTELIAL

O endotélio é uma camada celular contínua que separa o sangue da parede vascular e é o principal regulador da homeostase vascular através da liberação de substâncias com atividades pró e anticoagulantes, capazes de promover adesão celular e com ações vasoativas (Ganz et al. 2003).

Um dos principais alvos do acúmulo de patógenos periodontais e das citocinas circulantes é o endotélio. Os periodontopatógenos causam destruição do epitélio da bolsa periodontal e causam liberação de endotoxinas e exotoxinas na corrente sanguínea, gerando uma resposta inflamatória que caracteriza um quadro de disfunção endotelial (Hajishengallis et al. 2015) que pode contribuir para a ocorrência de aterosclerose, aumentando o risco de isquemia do miocárdio e infarto.

Durante a infecção periodontal, há um aumento de fibrinogênio, PCR e mediadores inflamatórios, como TNF-A, IL-1 e IL-6 (Ramirez et al. 2011). A presença dessas citocinas na circulação causa uma deficiência na produção de Óxido Nítrico (NO) que é a principal substância vasodilatadora liberada pelo endotélio (Luscher et al. 1993), sugere-se que este é o mecanismo pelo qual a disfunção endotelial pode promover a aterosclerose. Em um estudo realizado por Machado *et al.* (2013) foi observado que animais com periodontite apresentavam uma redução da vasodilatação endotélio-dependente devido à biodisponibilidade diminuída de NO e/ou outros mediadores de relaxamento derivado do endotélio.

O óxido nítrico (NO) é produzido a partir do aminoácido L-arginina em um processo catalisado pela enzima óxido-nítrico-sintase (NOS) (Ignarro et al. 1987). Existem três isoformas de NOS descritas na literatura, a NOS-1 está presente em neurônios e atua na regulação central da pressão sanguínea, no relaxamento do músculo liso e na vasodilatação via nervos periféricos. A NOS-2 ou óxido nítrico sintase induzida (iNOS) está presente na musculatura lisa e endotélio. A NOS-3 ou óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) produz NO no endotélio em condições basais (Forstermann et al. 1994). O óxido nítrico (NO) possui ação vasodilatadora, inibe a adesão e a agregação plaquetárias, limita o recrutamento vascular dos leucócitos e inibe a produção do fator tecidual (Yang et al. 2000) e diversos estudos atribuem seu

papel protetor na aterosclerose, na doença arterial coronariana e nas doenças tromboembólicas (Kingwell et al. 2000).

Assim, a disfunção endotelial, caracterizada por menor produção e/ou biodisponibilidade de NO, é um dos fatores que contribuem para o aparecimento das doenças cardiovasculares. Essa redução pode ser consequência da diminuição da atividade da NOS-3 ou aumento da degradação por espécies reativas de oxigênio.

Entretanto, alguns estudos demonstram que essa redução da biodisponibilidade de NO, pode ser compensada parcialmente pela ativação de vias alternativas, incluindo a produção e liberação de prostaciclina derivada da via das ciclooxigenases (COX) (Tang2009). Sendo assim, é observado um maior nível de expressão de COX-2 em situações de inflamação sistêmica com consequente disfunção endotelial (Mortone Dongari-Bagtzoglou 2001), sugerindo o possível papel vascular protetor da COX-2 através de prostanóides vasodilatadores como a Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (Lipsky2000).

Na Odontologia, inibidores seletivos de COX-2 como Etoricoxibe e Celecoxibe têm sido utilizados com sucesso, para controle de dor e inflamação em pacientes pré ou pós cirurgias periodontais (Steffens et al. 2010). Além disso, estudos demonstraram que o uso destes fármacos podem resultar em diminuição dos escores de edema e eritema gengival, diminuição da taxa de perda óssea e diminuição da perda de dentes. Azoubel et al. (2007) demonstraram que o emprego do etoricoxibe, um modelo experimental de doença periodontal, foi capaz de reduzir a inflamação e a reabsorção óssea alveolar. Entretanto, é necessária cautela com relação aos efeitos cardiovasculares de sua utilização.

#### 4.4 CICLOOXIGENASES

O ácido aracdônico (AA) apresenta papel regulador chave na fisiologia celular. Consiste em um ácido graxo de 20 carbonos, liberado a partir de fosfolipídios de membrana através da enzima fosfolipase A<sub>2</sub>, a qual pode ser ativada por diversos estímulos (químico, inflamatório, traumático, mitogênico). É convertido pela prostaglandina (PG) G/H sintase citosólica, também denominada ciclooxigenase (COX), nos compostos intermediários Prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) e Prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). A enzima prostaglandina G/H sintase, apresenta dois sítios catalíticos: o

sítio ciclooxygenase e o sítio peroxidase. O sítio ciclooxygenase converte o AA em PGG<sub>2</sub>, que por sua vez é reduzida ao intermediário instável, PGH<sub>2</sub> pelo sítio peroxidase. Finalmente, a PGH<sub>2</sub> é transformada, com a ajuda de várias enzimas teciduais específicas, em outras prostaglandinas ou tromboxanas que são importantes mediadores inflamatórios (Fitzgerald et al. 2001). A prostaglandina, em especial a PGE<sub>2</sub>, é a que mais tem sido correlacionada com a severidade da doença periodontal devido ao importante papel que exerce no processo de reabsorção do osso alveolar (Klein & Raisz 1970).

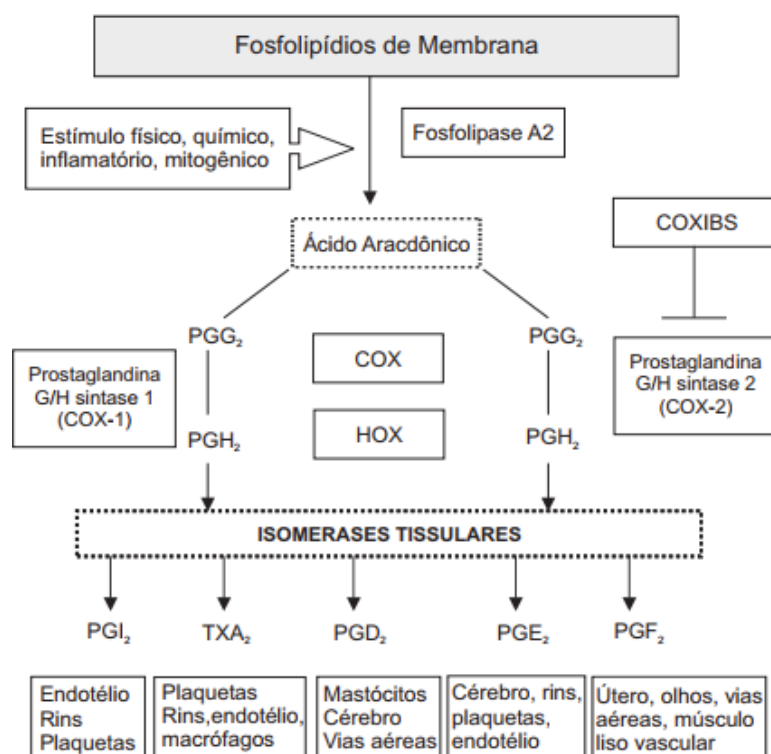


Figura 1: Produção de prostanóides (tromboxanos e prostaglandinas) a partir do metabolismo do ácido aracdônico. Imagem adaptada de (Fitzgerald et al. 2001)

As duas isoformas homólogas da COX definitivamente conhecidas, referidas como COX-1 e COX-2, apresentam padrões de expressão e atividades biológicas distintas. A COX-1 é uma proteína expressa constitutivamente, responsável pela produção fisiológica de prostaglandinas. A COX-2 está associada aos processos inflamatórios, porém contribui positivamente nos processos homeostáticos do organismo, como a função renal, cardiovascular e pulmonar e na organogênese normal de fetos. Desta forma, à COX-1 foi dado o nome de constitutiva; à COX-2, indutiva (Lopes et al. 2016). Recentemente foi proposta a existência de uma terceira

isoforma desta família enzimática, denominada COX-3, a qual, ao contrário da COX-1 e COX-2, não produziria prostanoídes pró-inflamatórios, mas sim substâncias antiinflamatórias. Estando presente em maior quantidade no córtex cerebral e na medula espinhal (Aoyama& Delmão 2021).

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) são ácidos orgânicos fracos que representam um grupo heterogêneo de compostos inibidores seletivos da cicloxigenase (COX). A inibição da COX e, portanto, a prevenção da formação de prostaglandinas, tromboxanas e prostaciclina (Salvi et al. 1997), explica as ações terapêuticas dos AINES contra a febre, hiperalgesia e inflamação (Silva et al. 2019). Os AINES podem apresentar diferentes graus de seletividade em relação às isoformas COX-1 e COX-2. Em função disso, são divididos em AINES tradicionais (AINETs), que atuam sobre as duas isoformas enzimáticas, e AINES seletivos para a COX-2, chamados de Coxibes (Braghirolli 2018).

#### 4.5 INIBIÇÃO SELETIVA DA COX-2

Conforme Oliveira et al. (2019), os principais efeitos indesejáveis dos AINES acontecem no aparelho gastrointestinal, as sintomatologias que são mais frequentemente observadas são dores abdominais, queimação e diarreia. Esses efeitos colaterais são ocasionados pela inibição da enzima COX-1 na mucosa gastrointestinal e da decorrente inibição da produção de prostaciclina e prostaglandinas no estômago. Em razão desses efeitos prejudiciais e diante do conhecimento sobre os perfis farmacológicos distintos entre as enzimas COX-1 e COX-2, foram desenvolvidas, a partir da década de 90, drogas antiinflamatórias não esteroidais com a finalidade de bloquear preferencialmente a enzima COX-2, denominadas coxibes, produzidas a partir de estímulos inflamatórios, sob condições patológicas, minimizando os efeitos colaterais no organismo e conferindo maior segurança quando da utilização de AINES, principalmente no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, quando a mesma é utilizada por períodos extensos (Emery 1996).

Os inibidores altamente seletivos da COX-2 foram inicialmente uma grande promessa no mercado devido à diminuição dos efeitos adversos gastrointestinais. O primeiro composto a ser aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para uso nos Estados Unidos foi o Celecoxibe, em dezembro de 1998 e no ano seguinte também

foi liberada a comercialização do Rofecoxib (Whelton 2001). E assim os COXIBES ligeiramente ficaram conhecidos. Seguido pela síntese de uma segunda geração de inibidores seletivos que incluíam Valdecoxib, Etoricoxib, Parecoxib e Lumiracoxib (Orlyvardeny, Scott, Solomon. 2008). Em 2001, o volume de vendas de Rofecoxib atingiu US\$2,5 bilhões no mercado de 80 países, graças a vigorosa campanha de marketing. Em 2004, diz-se que o volume mundial de vendas atingiu dez bilhões de dólares (Grosser et al. 2006).

No ano 2000, o estudo VIGOR (Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research) levanta as primeiras dúvidas a respeito do risco cardiovasculares dos Coxibes, dado o aumento de ocorrência de eventos cardíacos graves nos pacientes do grupo do Rofecoxib Vioxx®, comparativamente com os pacientes do medicados com Naproxeno (Bombardier et al. 2000). O risco CV relativa era de 1,1% no grupo de Rofecoxib contra 0,5% no Naproxeno. Os eventos CV incluídos: Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), angina instável, morte cardíaca súbita, eventos cerebrovasculares e vasculares periféricos. No mesmo ano, o Celecoxib foi comparado pela pesquisa CLASS (Celecoxib Longterm Arthritis Safety Study) com o Ibuprofeno e também o Diclofenaco e foi observado um acréscimo nos casos de eventos cardiovasculares, com um risco em 1,3% de pacientes com o Celecoxib contra 1,2% entre outros AINEs (Batlouni 2017).

Em 2002, observando que os casos de problemas CV tinham aumentados após a comercialização do Celecoxib e Rofecoxib, os COXIBES foram submetidos a uma nova investigação de segurança mediada pela Agência Europeia do Medicamento (EMA). No final de 2004, o Rofecoxib foi retirado de circulação de forma voluntária, a partir da interrupção da pesquisa APPROV (Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx), cujos dados mostraram sua associação ao aumento do número de eventos trombóticos, podendo levar a AVC e Infarto agudo de miocárdio (Hoefer 2004). No período entre sua liberação e a retirada do comércio (cinco anos), dois milhões de pacientes usaram Rofecoxib. Os investigadores da FDA estimaram ter havido quase 28 mil infartos do miocárdio e mortes súbitas nos Estados Unidos, entre 1999 e 2003 (Horton 2004).

Em julho de 2005, como resultado do procedimento de revisão de segurança dos Coxibes realizado pela EMA, o Comité de Medicamentos de Uso Humano, (CHMP, do inglês Committee for Medicinal Products for Human Use) concluiu que o aumento do risco CV dos Coxibes é um efeito característico desta classe, estando associado com o tempo de duração do tratamento e a dose administrada. Portanto a grande maioria dos fármacos seletivos para COX-2 foram retirados do mercado mostrando que a simples teoria inicial dos inibidores seletivos era muito mais complexa do que se pensava. A tabela (tabela 1) resume as datas de surgimento e a situação atual dos Coxibes.

Inibidores seletivos da COX-2		
Composto (nome comercial)	Ano de surgimento	Situação
Rofecoxibe <sup>1</sup> (Vioxx)	1999	Retirado em 2004
Celecoxibe <sup>1</sup> (Celebra)	1999	Disponível no mercado
Valdecoxibe <sup>1</sup> (Bextra)	2001	Retirado em 2005
Parecoxibe <sup>1</sup> (Bextra IM/ IV- pró-droga valdecoxibe)	2001	Apenas uso hospitalar
Etoricoxibe <sup>2</sup> (Arcoxia)	2002	Dose de 120 mg retirada em 2008
Lumiracoxibe <sup>2</sup> (Prexige)	2005	Retirado em 2008

Tabela 1: Coxibes, sua data de aprovação e retirada do mercado. Adaptado de Hinz et al., Patrignani et al. Mendes et al.2012.

No Brasil apenas o Celecoxibe e o Etoricoxibe são comercializados, porém com retenção de receita e com clara indicação dos riscos cardiovasculares (Mendes et al. 2012).

#### 4.6 COMPLICAÇÕES CARDIOVASCULARES RELATIVAS A INIBIÇÃO DAS CICLOOXIGENASES

O uso crônico de Coxibes pode acarretar eventos cardiovasculares e tromboembólicos (Chahade, Giorgi, Skajubok.2008). Para manutenção do fluxo sanguíneo normal e a apropriada resposta trombogênica à lesão vascular é necessário um adequado equilíbrio entre a atividade do tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) produzido pela plaqueta e a ação da prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) derivada da célula endotelial (Figura2).

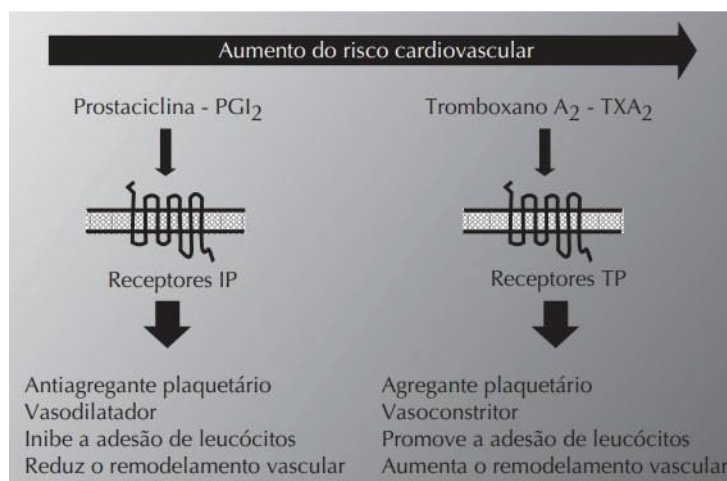


Figura 2: Efeitos vasculares da prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e do Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Adaptado de Mitchell, Warner (2006).

A PGI<sub>2</sub> é o prostanóide que em maior quantidade é produzido no endotélio, inibe a agregação plaquetária, é um potente vasodilatador e previne a proliferação de células do músculo liso vascular, é um produto derivado, principalmente, da COX-2 e a sua biossíntese é aumentada em situações onde as plaquetas se encontram ativadas, como na aterosclerose, em resposta a um aumento das interações entre as plaquetas e os vasos sanguíneos (Fries e Grosser 2005). Por outro lado, o TXA<sub>2</sub> é o maior produto da COX-1 proveniente das plaquetas, sendo responsável pela agregação plaquetária, desempenha ainda um papel importante como vasoconstritor e provoca proliferação vascular (FitzGerald 2004).

Passou-se a perceber a necessidade de investigar mais a fundo a importância do equilíbrio entre TXA<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> após estudos feitos com ácido acetilsalicílico (AAS), o qual inibe a COX-1 de forma irreversível, por meio da acetilação do sítio ativo da enzima. Portanto, reduz a síntese de TXA<sub>2</sub> pela plaqueta em cerca de 95% com mínimo efeito na produção de PGI<sub>2</sub> pelas células endoteliais. Essa condição gera um ambiente antitrombótico. A utilização diária de baixas doses desse fármaco em pacientes de risco reduz a ocorrência de eventos trombóticos (Capone et al. 2010)

Nos anos 90, acreditava-se que as duas isoformas da COX, diferenciavam-se principalmente em seus modelos de expressão celular, sendo a COX-1 expressa constitutivamente, enquanto a COX-2 induzida. Diante dessa teoria, acreditava-se que a inibição da COX-1 geraria efeitos gastrointestinais indesejados, e a inibição da COX-2 responderia pelos efeitos terapêuticos (Mitchell 1993). Entretanto, logo ficou evidente que a COX-2 não era expressa somente durante a inflamação, mas poderia

estar presente em vários tecidos durante condições fisiológicas, inclusive em células vasculares (Batlouni 2010). E sua inibição se tornou muito mais complexa que o sugerido pela hipótese inicial.

O mecanismo de ação dos coxibes se dá através da diminuição da produção endotelial de PGI<sub>2</sub>, enquanto mantêm a produção de TXA<sub>2</sub> nas plaquetas inalterada, o que aumenta a ativação das plaquetas. Por um lado, a diminuição da síntese vascular de PGI<sub>2</sub> tem como consequência um efeito pró-trombótico, uma vez que a mesma deixa de inibir a agregação plaquetária, e por outro a síntese de TxA<sub>2</sub> pró-trombótico não é alterada. Este desequilíbrio pode aumentar o risco de trombose e de lesões isquêmicas (Antman et al.2007)

## **5- MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 AMOSTRA**

Para o presente estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar (machos), de 3 a 4 meses de idade, peso médio de 400 gramas. Foram utilizados 42 animais divididos em 4 grupos experimentais, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Paraná. Os quais foram mantidos em ambiente com temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo de claro/escuro (12/12h) controlados automaticamente e com livre acesso à alimentação e água. Os protocolos de experimentação foram submetidos e aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPR, segundo protocolo 23075.082142/2019-27(ANEXO1).

### **5.2 INDUÇÃO DA PERIODONTITE ATRAVÉS DE LIGADURAS**

O procedimento de colocação das ligaduras foi feito após a anestesia e sedação utilizando Quetamina e Xilasina (75 e 15 mg/kg respectivamente), injetados via intraperitoneal.

Após a anestesia, os animais foram posicionados em uma mesa operatória, realizando a abertura bucal. Os dentes dos animais foram levemente luxados com auxílio de uma sonda exploradora para criar espaço para a colocação dos fios de algodão (Tex 34 Glacê 50- Lipasa- Brasil) nos primeiros molares inferiores e segundos

molares superiores bilateralmente (Figura3), ficando o nó na região mesial no inferior e lingual no superior (Galvão 2003, Salay 1982, Ate 2013, Struillou 2010). Este procedimento atua como um irritante gengival que favorece o acúmulo de biofilme bacteriano, e conseqüentemente, uma resposta inflamatória com destruição dos tecidos periodontais.

Os animais falso-operados foram submetidos ao mesmo procedimento, entretanto não foi feita a fixação da ligadura.

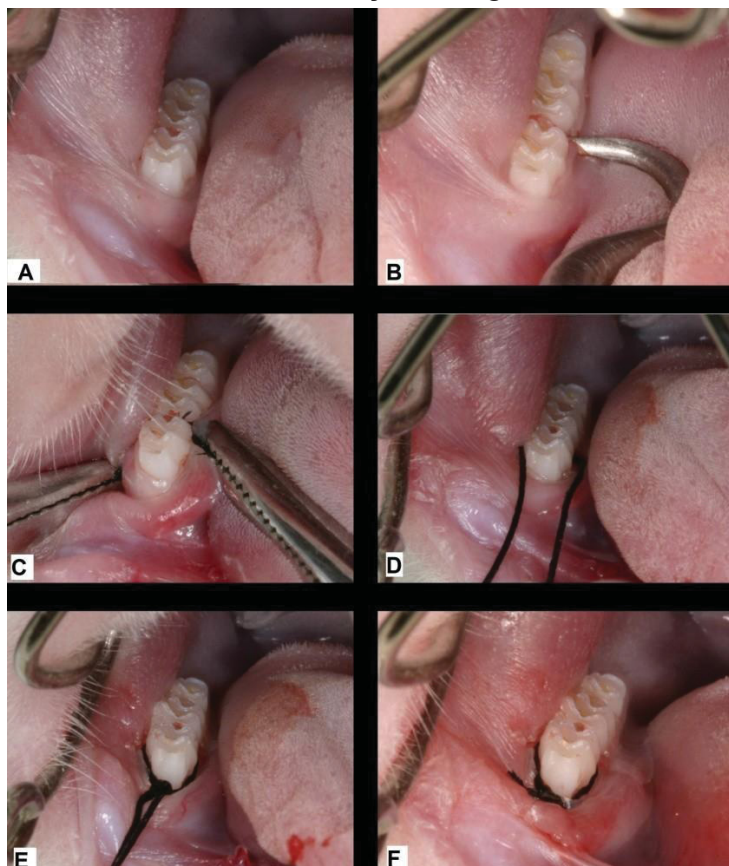


Figura 3: Colocação das ligaduras nos ratos. A: Foto inicial. B: Dente sendo luxado com auxílio de uma sonda exploradora para criar espaço para colocação da ligadura. C e D: colocação do fio ao redor do dente. E: Confecção do nó da ligadura. F: Ligadura finalizada. Fonte: Autor

### 5.3- ADMINISTRAÇÃO DA MEDICAÇÃO

A medicação administrada foi o Etoricoxibe 90mg (Arcoxia-Merck Sharp & Dohme). Foi feita uma solução utilizando o comprimido triturado (manualmente) diluído em água destilada na concentração de 10 mg/kg (Holzhausen et al., 2005). A solução foi administrada via oral, por meio de gavagem, diariamente do dia 14 até o dia 20. Os grupos veículo receberam água destilada também através da gavagem.

#### 5.4-LESÃO DE ISQUEMIA CARDÍACA INDUZIDA POR ISOPRENALINA

As lesões miocárdicas foram induzidas nos animais através da administração de Isoprenalina (80 mg/kg, via subcutânea) por dois dias consecutivos, conforme preconizado por Rona et al. 1959. A Isoprenalina é um potente agonista B-adrenérgico empregado no tratamento de emergências alérgicas, bradicardia ventricular e paracardíaca. Este fármaco, em altas doses, produz lesões semelhantes ao Infarto de miocárdio em humanos, devido seu efeito de aumento da frequência cardíaca e demanda de oxigênio (Huang et al.2018).

#### 5.5- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O estudo iniciou-se com 42 animais que no dia zero foram separados randomicamente em 2 grupos, metade dos animais passou pelo procedimento de colocação da ligadura para indução da periodontite e a outra metade foi falso-operada(as ligaduras foram colocadas e imediatamente removidas). Neste procedimento foram perdidos 8 animais. Quatorze dias após o procedimento os ratos foram novamente separados randomicamente em 4 grupos (2 grupos de 9 animais e 2 grupos de 8 animais) e receberam o tratamento farmacológico, via gavagem, conforme indicado abaixo:

- Ligadura+Etoricoxibe: 9 ratos receberam ligaduras e tratamento via oral (Etoricoxibe 10 mg/kg/dia, v.o.)
- Ligadura+Veículo: 8 ratos receberam ligaduras e tratamento via oral com água destilada (1 mL/kg/dia, v.o.);
- Falso Operados+Etoricoxibe: 9 ratos foram falso-operados e receberam tratamento via oral (Etoricoxibe 10 mg/kg/dia, v.o.);
- Falso Operados+Veículo: 8 ratos foram falso-operados e receberam tratamento via oral com água destilada (1 mL/kg/dia, v.o.);

Nos dias 19 e 20 todos os animais receberam uma injeção subcutânea de isoprenalina (80 mg/kg, s.c.) para indução do infarto agudo do miocárdio. No dia 21, os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica -quetamina e xilazina-. Os

corações retirados para análise histológica, as mandíbulas e a maxilas dissecadas para análise morfométrica da perda óssea alveolar induzida pela colocação das ligaduras (Figura 4).

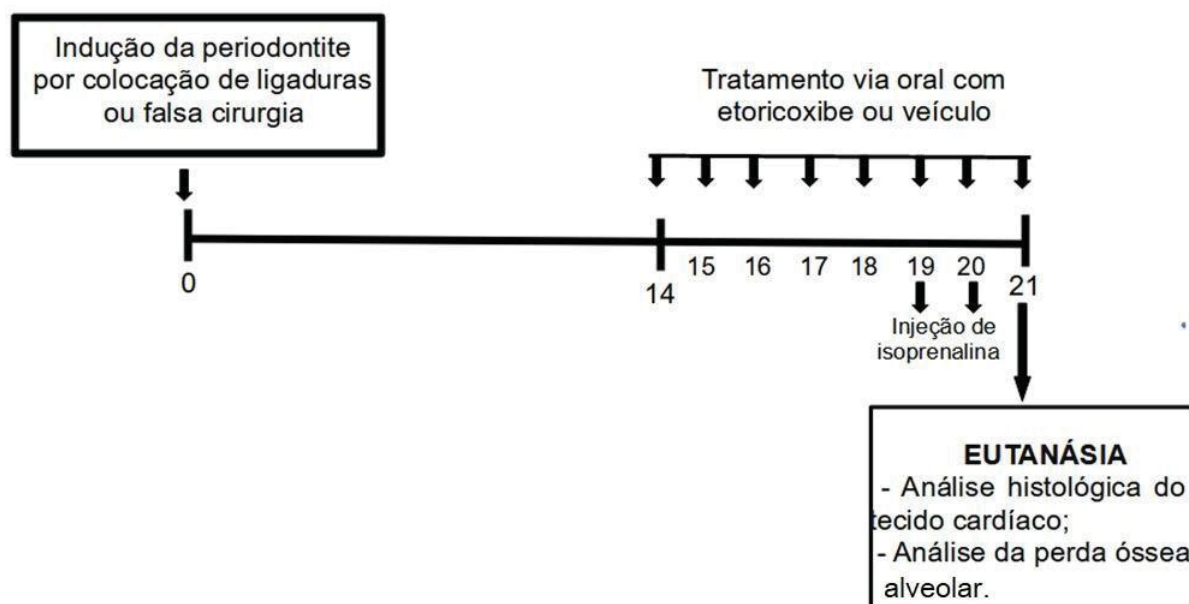


Figura 4 :Representação cronológica do protocolo experimental do estudo.

## 5.6- AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA PERDA ÓSSEA

Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica (Quetamina e Xilasina). Mandíbula e maxila foram retiradas para análise da perda óssea alveolar induzida pela ligadura.

O método utilizado para mensurar o tecido ósseo destruído durante o período experimental foi através da determinação da distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar, conforme descrito por Klausen (1991).

Os procedimentos de preparo das peças e de análise morfométrica foram realizados no Laboratório de Patologia da Universidade Federal do Paraná. Para remoção do tecido mole das hemi-mandíbulas e maxilas, as amostras foram submetidas a fervura por 30 minutos e, posteriormente, imersas em Peróxido de Hidrogênio 3% por 12 horas. Logo após, as peças foram secas e imersas e imediatamente removidas da solução de azul de metileno (1g/100ml) para uma melhor visualização da junção amelocementária.

A análise morfométrica conduzida no presente estudo foi realizada por meio da avaliação de fotografias digitais das hemi-mandíbulas e maxilas (faces vestibulares e

linguais/palatinas). As amostras foram fotografadas com uma câmera fotográfica (SLRCANON EOS 7D Mark II / LENTE EF 100 mm f/2.8L Macro) acoplada em um tripé. Para a coleta de dados foram consideradas cinco medidas lineares para cada face dos dentes inferiores e três medidas lineares para cada face dos dentes superiores (Figura 5). As medidas em pixels foram convertidas em milímetros, utilizando como escala as marcas da régua endodôntica presente nas imagens, através do programa Image J (ImageJv.1.30 Wayne Rasbans, National Institute of Health, EUA).

Um examinador, calibrado e cego aos grupos experimentais, calculou as medidas das distâncias lineares da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar através programa Image J utilizando as 5 medidas lineares para cada face dos primeiros molares inferiores e 3 medidas lineares para os segundos molares superiores. Os dados obtidos durante o período de calibração foram transferidos parao programa Microsoft Office Excel™ 2019 e analisados nos programas SPSS® (versão 16, SPSS, Chicago, III). As medidas foram replicadas de forma aleatória após um período mínimo de 2 semanas, pelo mesmo examinador cego. O erro do método foi avaliado pelo Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI), o erro sistemático intra-examinar no presente estudo demonstrou excelente concordância (CCI=0,97).

A mesma metodologia utilizada para a calibração, foi utilizada para a coleta dedados oficiais, a média das medidas lineares dos dentes avaliados foi utilizada para expressar a perda óssea alveolar.

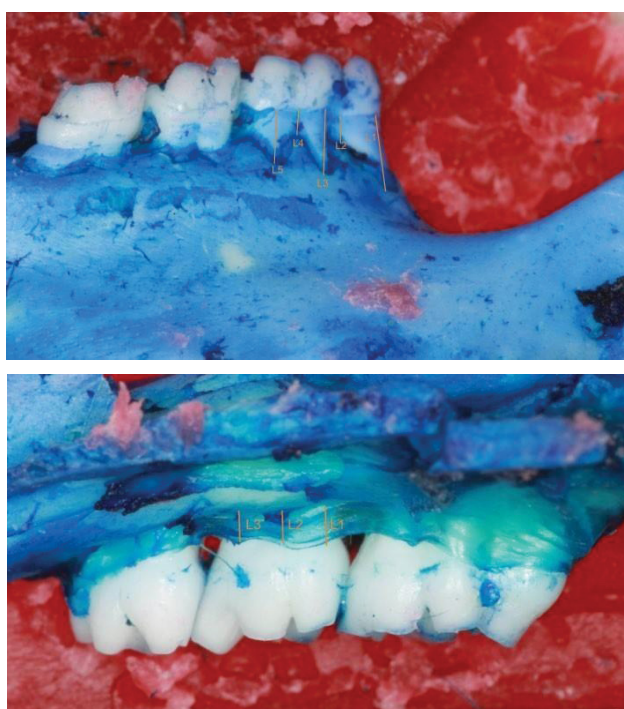


FIGURA 5: Mandíbula e Maxila, respectivamente, com suas respectivas medidas lineares para mensurar a perda óssea alveolar média(mm).

## 5.7- ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO CARDÍACO

Nos dias 19 e 20, após passarem pelo procedimento de ligadura ou falsa cirurgia, os ratos receberam uma injeção subcutânea de Isoprenalina (80mg/kg), para indução do infarto agudo do miocárdio. No dia 21, os animais foram eutanasiados e os corações retirados para análise histológica, os mesmos foram irrigados com solução fisiológica afim de remover remanescentes sanguíneos (Figura 6).



FIGURA 6: Foto do coração fixado em Formo 10%.

As amostras dos corações foram fixadas em Formol 10%. Foi realizado um corte longitudinal com lâmina de bisturi na região de ventrículo esquerdo, as peças foram para o processamento histotécnico onde passaram pelas fases de desidratação (1 hora em álcool 70%, 1 hora em álcool 80%, 1 hora em álcool 90% e 2 banhos de 1 hora em álcool 100%), diafanização (3 banhos de 1 hora em xilol) e parafinização (2 banhos de 1 hora em parafina). Após serem emblocadas em parafina, foram seccionados em cortes de 5 $\mu$ m e esticados em lâminas. Previamente a coloração, os cortes foram hidratados em xilol, seguido por sequência decrescente de etanol, finalizando com coloração em Hematoxilina e Eosina e Tricrômio de Mallory.

Para analisar alterações presentes no tecido cardíaco, as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico (ZEISS) 20X e receberam escores (0, 1, 2 e 3) quanto a presença do infiltrado inflamatório. Sendo 0-ausente, 1- pouco presente, 2-moderadamente presente e 3- muito presente, seguindo o modelo de Mendes et

al(2012). Determinou-se a média dos escores das áreas em que havia infiltrado inflamatório previamente identificadas por um Patologista.

Além disto, também foi avaliado o diâmetro dos cardiomiócitos, utilizando microscópio de 40x (ZEISS), foram selecionadas randomicamente 10 regiões de cada lâmina e a medida de 10 células em cada campo. A área de cada célula foi medida com Image J, e então a média do diâmetro foi calculada (FIGURA 7) (Wu et al. 2017). Os dados obtidos foram organizados na forma de gráfico para realização da análise descritiva.

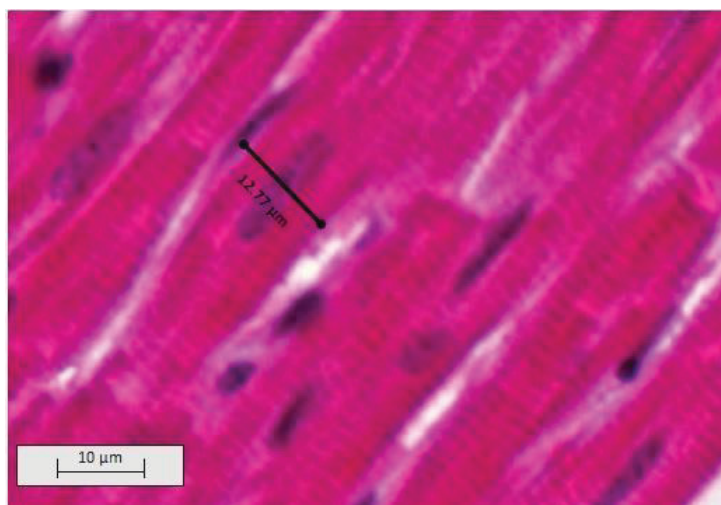


Figura 7: Diâmetro dos cardiomiócitos utilizando o programa VS VIEWER.

Além da coloração com hematoxilina e eosina, as lâminas foram coradas com Tricrômico de Mallory para a análise quantitativa de colágeno. As lâminas foram analisadas em aumento microscópico de 20x (ZEISS), foram selecionadas 6 regiões sem vasos e 6 regiões com vasos. A fração de volume do colágeno foi calculada pela razão percentual da área do tecido miocárdico corado positivamente para as fibras colágenas (quantidade absoluta de colágeno) e a área total do tecido miocárdico em cada região ventricular examinada (Wu et al. 2021). Os dados obtidos foram organizados na forma de gráfico para realização da análise descritiva.

Um examinador, calibrado e cego aos grupos experimentais, analisou as lâminas para determinação do escore inflamatório, diâmetro dos cardiomiócitos e quantificação de fibras colágenas, no período de 24 horas, 48 horas e 1 semana. Os dados obtidos no período de calibração foram transferidos para o programa Microsoft Office Excel™ 2019 e analisados nos programas SPSS® (versão 16, SPSS, Chicago, III).

Todas as análises histopatológicas foram feitas com auxílio de um patologista com experiência em tecido cardíaco de ratos.

## 5.8- COMPONENTES E REAGENTES UTILIZADOS

As seguintes substâncias foram utilizadas no presente estudo:

- Etoricoxibe (Arcoxia-MerckSharp & Dohme);
- Hematoxilina, Eosina, Azul de metileno, Tricrômico de Mallory.
- Xilol (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil)
- Xilazina (Ronpum, Bayer; São Paulo, SP, Brasil);
- Quetamina (Dopalen, Ceva; Paulínia, SP, Brasil);
- Isoprenalina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).
- Formol

## 6- RESULTADOS

Durante a fase experimental da indução da lesão isquemia cardíaca induzida por Isoprenalina ocorreu a perda de alguns animais. Sendo a quantidade final de animais em cada grupo: 4 animais ligadura + etoricoxibe, 1 animal ligadura + veículo, 4 animais falso-operados + etoricoxibe e 1 animal falso-operado + veículo. Visto isso, os resultados foram analisados de forma descritiva.

### 6.1- PERDA ÓSSEA ALVEOLAR MÉDIA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO DE COX-2

No vigésimo primeiro dia 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. Comparando apenas os grupos falso-operados, o grupo que recebeu o tratamento via oral com etoricoxibe demonstrou perda óssea alveolar média maior (Gráfico1).

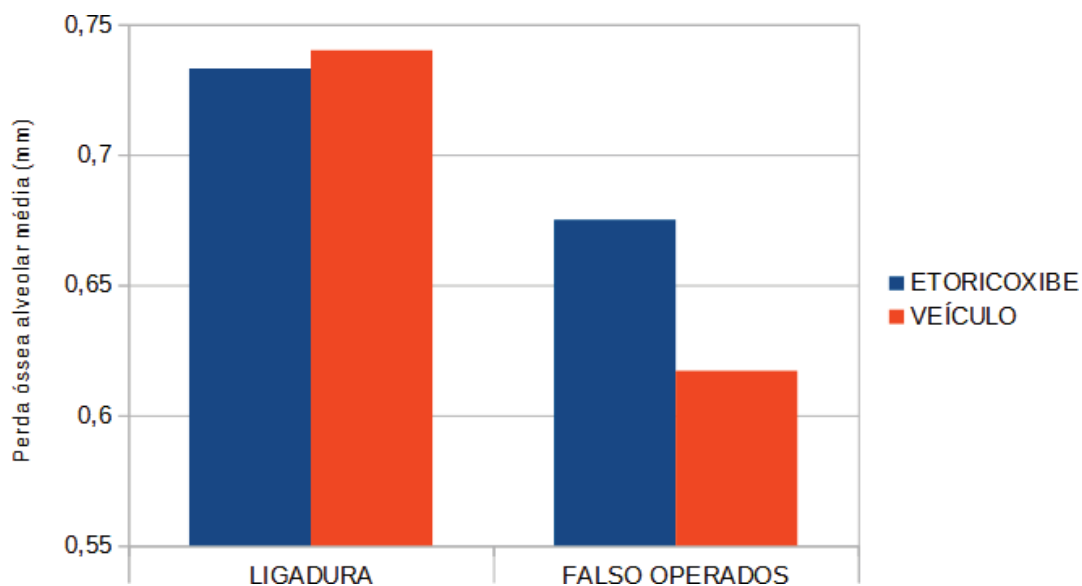


Gráfico 1: Representação gráfica da perda óssea alveolar média (mm) em um modelo experimental de periodontite com inibição de COX-2. Não houve diferença estatística entre os grupos ligadura. Entre os grupos falso-operados, o grupo que recebeu o tratamento via oral com etoricoxib e demonstrou perda óssea alveolar média maior.

## 6.2- HISTÓLOGIA CARDÍACA DOS RATOS SUBMETIDOS A LESÃO DE ISQUEMIA CARDÍACA EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PERIODONTITE COM INIBIÇÃO DE COX-2: AVALIAÇÃO DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO

Os animais foram eutanasiados no dia 21 do experimento e tiveram seus corações removidos para análise histológica. As lâminas foram scaneadas pelo sistema Zeiss/MetaSystem e avaliadas no sistema computadorizado de imagens (VSVIEWER) 20x recebendo escores (0,1,2 e 3) quanto a presença do infiltrado inflamatório. Sendo 0-ausente,1-pouco presente,2- moderadamente presente e 3- muito presente, seguindo o modelo de Mendes et al(2012). A figura a seguir (Figura 8) mostra os cortes histológicos realizados.

A imagem A representa o tecido cardíaco de um animal *naive*, ou seja, que não passou por nenhum procedimento. Sendo assim, nota-se a ausência de infiltrado inflamatório, recebendo o score 0.

Nas demais imagens (B, C, D e E), observa-se a presença de infiltrado inflamatório em diferentes concentrações, onde aponta a seta. As alterações são mais evidentes nos grupos Ligadura + Etoricoxibe e Falso-operados + Etoricoxibe.

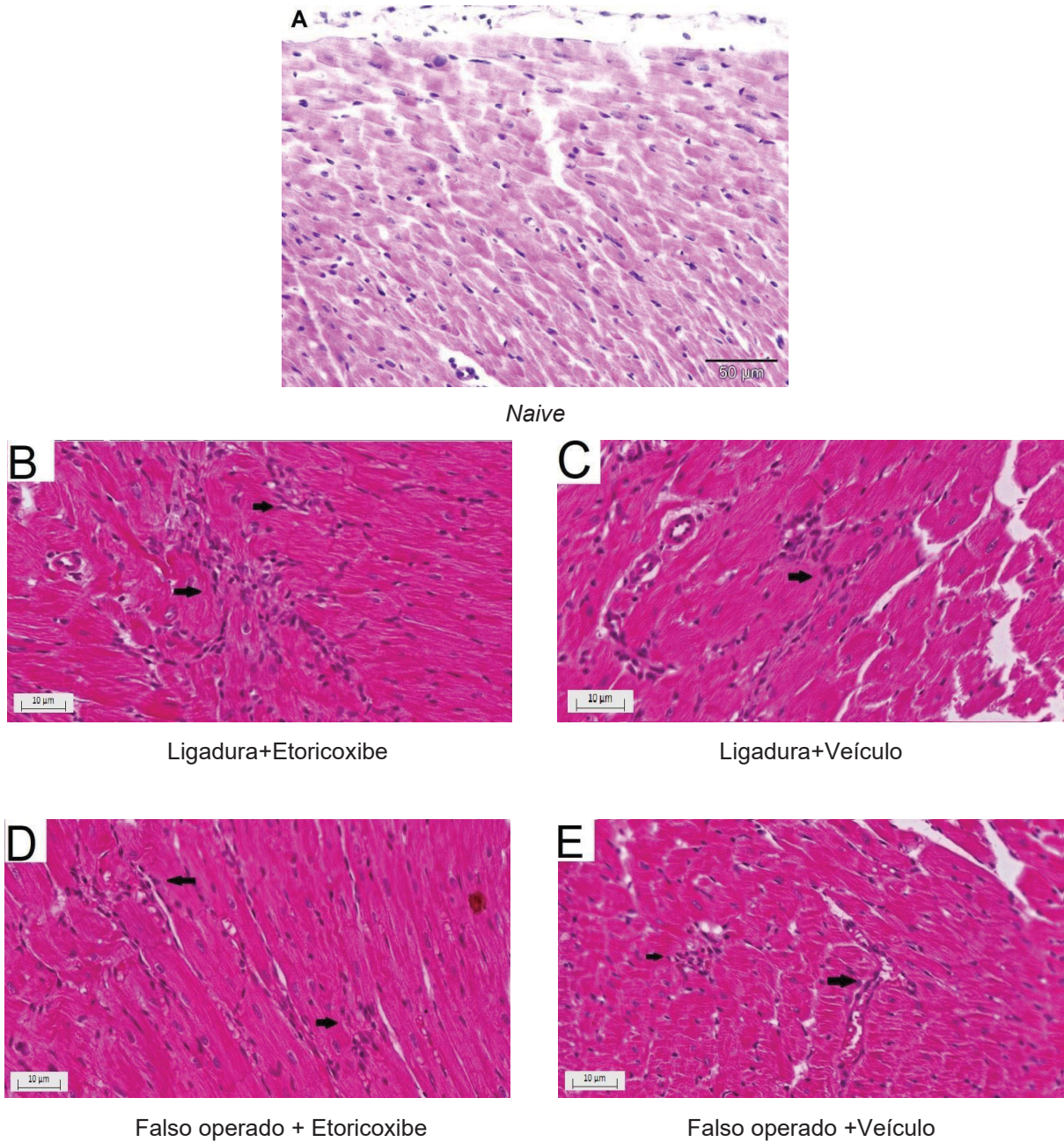


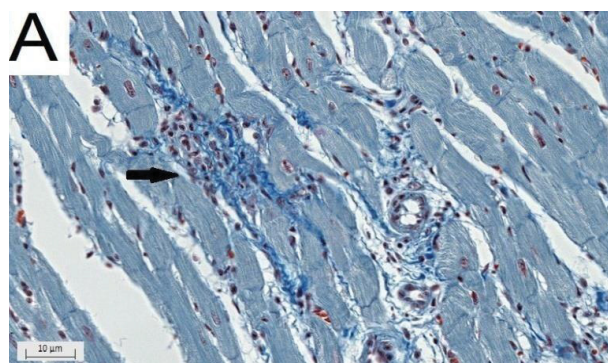
FIGURA 8: Efeito do etoricoxibe sobre o tecido cardíaco infartados com doses subcutâneas de Isoprenalina em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa cirurgia. As imagens representam a histologia cardíaca da região do ventrículo esquerdo em coloração hematoxilina e eosina. As setas apontam para a maior concentração de infiltrado inflamatório, sendo observado um maior escore inflamatório nos grupos ligadura+ etoricoxibe (B) e falso operados + etoricoxibe (D).

6.2.1- Histologia cardíaca dos ratos submetidos a lesão de isquemia cardíaca em um modelo experimental de periodontite com inibição de COX-2: avaliação de infiltrado inflamatório: quantificação de fibras colágenas.

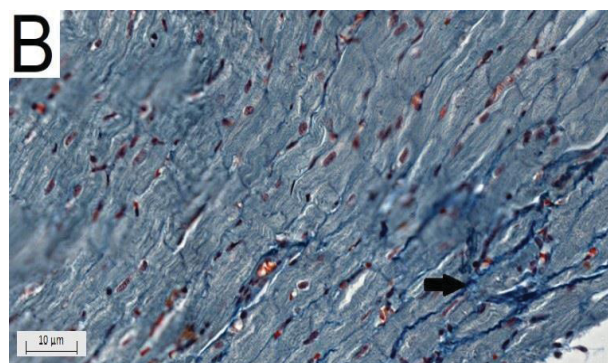
Com o objetivo de avaliar a presença de fibras colágenas no tecido cardíaco dos animais infartados, foram confeccionadas lâminas com coloração Tricrômico de Mallory (FIGURA 8).

Nas imagens (A,B,C e D), observa-se a presença de fibras colágenas em diferentes concentrações onde aponta a seta.

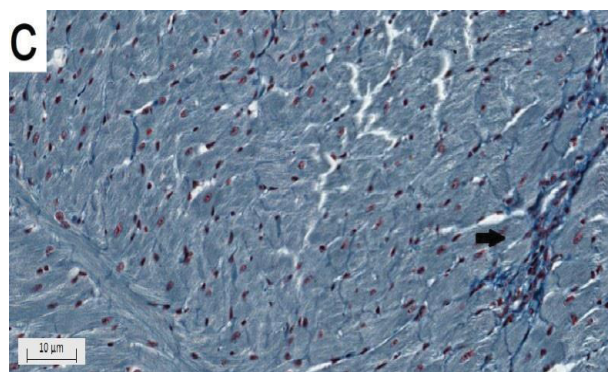
O grupo Ligadura + Etoricoxibe apresenta a maior quantidade de fibras colágenas (FIGURA 8)



Ligadura+Etoricoxibe



Ligadura+Veículo



Falso operado+Etoricoxibe

FIGURA 9: Efeito do etoricoxibe sobre o tecido cardíaco infartados com doses subcutâneas de Isoprenalina em animais submetidos ao procedimento de ligadura ou falsa cirurgia. As imagens

representam a histolgia cardíaca da região do ventrículo esquerdo corado com Tricrômio de Mallory, o qual apresenta as fibras colágenas de maneira diferenciada facilitando a distinção do tecido conjuntivo.

No grupo ligadura+etoricoxibe (A) é possível observar fibras colágenas em maior quantidade quando comparado aos demais grupos (B,C e D) (Gráfico 2).

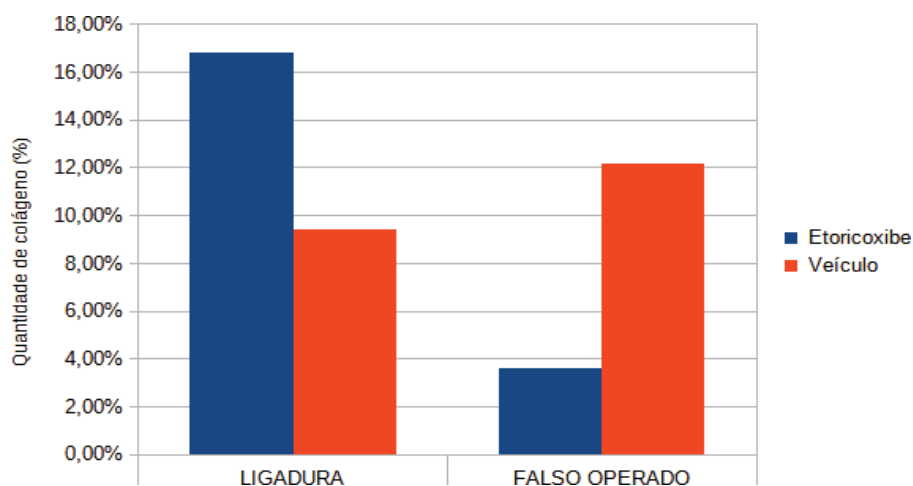


Gráfico 2: Percentual de fibras colágenas presentes nos cortes histológicos do ventrículo esquerdo dos animais. Observou-se que o maior percentual de fibras colágenas está presente no grupo ligadura+etoricoxibe (16,80%).

#### 6.2.2- Diâmetro dos Cardiomiócitos

O diâmetro dos cardiomiócitos também foi analisado nos cortes histológicos do ventrículo esquerdo dos animais. Os cortes foram avaliados no sistema computadorizado de imagens (ZEISS) 40x, foram selecionadas 10 secções de cada espécime randomicamente selecionados, 10 células de cada campo e então a média do diâmetro foi calculada.

O grupo ligadura+etoricoxibe apresentou o maior valor médio de diâmetro dos cardiomiócitos (12,33 $\mu$ m) (Gráfico 4).

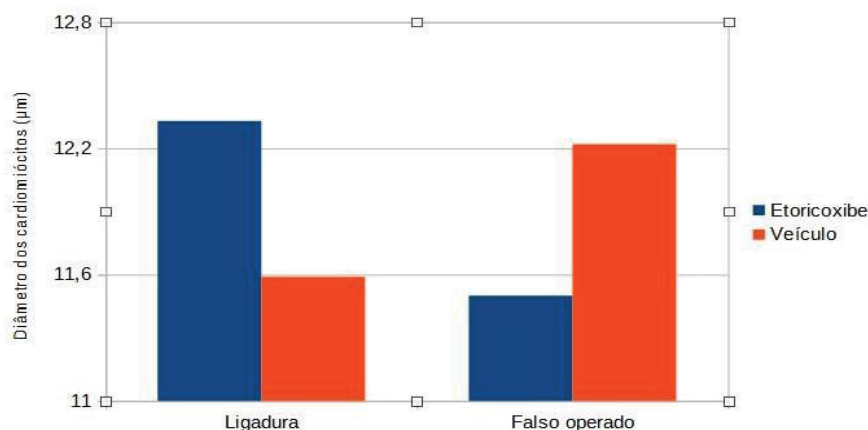


Gráfico 3: Representação média do diâmetro dos cardiomiócitos ( $\mu\text{m}$ ) através da análise dos cortes histológicos do ventrículo esquerdo dos animais. Observa-se que o grupo ligadura+etoricoxibe apresenta o maior diâmetro das células (média de  $12,33\mu\text{m}$ ).

## 7- DISCUSSÃO

A doença periodontal é uma desordem imunoinflamatória associada a biofilmes disbióticos e caracterizada pela destruição dos tecidos de suporte dentário como resultado da resposta imunológica exacerbada do hospedeiro ao desafio bacteriano (Tonetti et al. 2018). É considerada um problema de saúde pública, sua forma severa acomete cerca de 11% da população mundial, com pico de prevalência por volta dos 40 anos de idade (Kassebaum et al. 2014). Segundo Hajishengallis em 2015, a cavidade oral dispõe de patógenos periodontais e mediadores inflamatórios, que podem entrar na corrente sanguínea e se disseminarem, exercendo um impacto na inflamação sistêmica e, nesse contexto, a periodontite tem sido apontada como um possível fator de risco das doenças cardiovasculares, principalmente aterosclerose e hipertensão.

A inflamação sistêmica gerada pelos patógenos periodontais aumenta a expressão de moléculas de adesão, estimula a síntese de citocinas pró-inflamatórias e a produção de espécies reativas de oxigênio, resultando na disfunção endotelial, a qual está associada ao aumento da expressão de COX-2 (Tsioufis et al. 2011). Além do papel da COX-2 na inflamação, esta isoenzima pode ter um papel protetor na doença periodontal, através da produção de vasodilatadores (Foundi et al. 2009). Sendo assim, a sua inibição, com uso de COXIBES, apresenta efeitos adversos no sistema cardiovascular (Batlouni 2010). O objetivo deste estudo é compreender a relação da doença periodontal e inibidores seletivos de COX-2 com o risco de

desenvolvimento de doenças cardiovasculares, utilizando um modelo experimental de periodontite em ratos.

Estudos utilizando modelos animais são fundamentais para a compreensão da doença periodontal. Diferente de muitas doenças infecciosas humanas, a periodontite é amplamente difundida no reino animal. Na literatura vários animais susceptíveis são descritos, incluindo ratos, camundongos, hamsters, gatos, cachorros, raposas, cavalos, ovelhas e primatas. Pela semelhança do homem com os primatas estes são os melhores modelos para estudo. Contudo, o rato é o animal mais frequentemente utilizado em estudos de periodontite experimental, pois, comparado aos primatas, apresentam menor custo para sua manutenção, são de fácil manipulação e apresentam características do periodonto - bem como da patogênese da doença periodontal e da microbiota periodonto patogênica - semelhantes ao homem (Klausen 1991; Swerts 2014). Entre as espécies mais utilizadas destacam-se Wistar e Sprague-Dawley (Struillou et al. 2010).

A indução de periodontite em ratos pode ser obtida de algumas maneiras, como, por exemplo, a inoculação oral de periodontopatógenos, incluindo *A. actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis* (Garlet et al. 2006), através da manipulação dietética (Sallay et al. 1982; Klausen 1991) ou por meio da ligadura ao redor da região cervical do molar (Kim et al. 2012). A periodontite induzida por ligadura, é uma metodologia confirmada pela literatura (Fernandes et al., 2007; Semenoff et al. 2006), na qual é introduzido um fio de algodão, seda ou nylon na área cervical dos molares maxilares ou mandibulares de ratos para induzir grande acúmulo de placa levando a alterações no tecido periodontal similares às observadas em periodontites humanas (Klausen et al. 1991).

Trabalhos prévios têm mostrado que para o desenvolvimento de alterações sistêmicas decorrentes da doença é necessário pelo menos a colocação de três ligaduras (Ma et al. 2011). Sendo assim, na presente pesquisa optou-se pelo modelo de indução de doença periodontal através de quatro ligaduras de fio algodão em ratos Wistar.

As evidências da literatura demonstram que o uso de fármacos inibidores seletivos de COX-2, como, celecoxibe e etoricoxibe, resultam na diminuição da perda óssea alveolar. Holzhausen e colaboradores (2002) realizaram um estudo com DP induzida em ratos, previamente tratados com celecoxibe, e observaram melhora nos parâmetros relacionados a doença periodontal, incluindo uma redução na perda óssea

alveolar. No presente estudo, o etoricoxibe não apresentou efeito protetor para a perda óssea alveolar porque o seu uso foi iniciado no dia 14, quando o processo inflamatório já estava estabelecido.

Apesar da sua eficácia, o uso destes fármacos (inibidores seletivos de COX-2) está associado ao risco de complicações cardiovasculares. Com a inibição da enzima COX-2, ocorre um desequilíbrio entre alguns eicosanóides (TXA<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>), podendo assim explicar o aumento de casos cardiovasculares e trombóticos procedentes da administração prolongada e contínua (Beirão 2016). Por esse fato, em 2004, o Rofecoxib foi retirado do mercado. Acredita-se que no período entre sua liberação e a retirada do comércio (cinco anos), dois milhões de pacientes usaram Rofecoxib. Os investigadores da FDA estimaram ter havido quase 28 mil infartos do miocárdio e mortes súbitas nos Estados Unidos (Horton 2004). No Brasil, apenas o celecoxibe e o etoricoxibe são comercializados, ambos com retenção de receita médica (Resolução RDC79).

Com o objetivo de avaliar alterações sistêmicas relacionadas à periodontite e à inibição da COX-2, o presente estudo optou pelo uso do fármaco Etoricoxibe, por possuir seletividade 106 vezes maior pela COX-2, quando comparado ao celecoxibe (Saxena 2005). Sua administração iniciou-se a partir do décimo quarto dia da instalação das ligaduras, período no qual já é observada significativa perda óssea alveolar e alterações sistêmicas (Graves et al. 2012) e foi realizada durante sete dias consecutivos, sendo considerado como uso crônico para o metabolismo dos roedores. 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, assim como modelo reportado em outros trabalhos (Filho et al. 2011; Asaikumar et al. 2019; Zhou et al. 2015).

Um modelo amplamente usado para indução de infarto agudo de miocárdio (IAM) em ratos é o modelo de ligadura coronariana (Guarita-Souza 2004). Porém, trata-se de um modelo experimental mais complexo, sendo necessário acesso cirúrgico e suporte ventilatório. Uma alternativa a este modelo é a administração subcutânea de Isoprenalina (Prince et al. 2011), método que apresenta boa especificidade, reprodutibilidade e possui baixo custo. A Isoprenalina é uma catecolamina sintética, agonista  $\beta$ -adrenérgico que em altas doses administradas uma ou duas vezes a cada 24 horas (ou em doses reduzidas, administradas por período

prolongado) provoca um severo estresse no miocárdio, resultando em apoptose (Song et al. 2011) e necrose do miocárdio. Sua administração é feita via subcutânea (sc.) ou intraperitoneal (ip.). Esta droga provoca desequilíbrio entre a demanda energética do miocárdio e o fluxo coronariano ao miocárdio. A hipóxia do miocárdio resulta, então, na necrose cardíaca, com lesões semelhantes ao infarto miocárdico (Senthil et al. 2007).

No presente trabalho, a indução do IAM foi realizada através da administração subcutânea de Isoprenalina (80mg/kg) por dois dias consecutivos. Em relação a taxa de mortalidade do experimento, Acikel et al em 2005 relataram mortalidade de 33,33% em ratos submetidos a administração de isoprenalina, na presente pesquisa este valor foi de 70,5%. Tal fato pode estar relacionado com a idade (média de 3-4 meses) e o peso (média de 400 gramas) dos animais utilizados. Em outros estudos, como por exemplo o de Filho et al. (2011) em que a taxa de mortalidade é menor (25%), foram usados ratos mais novos e de menor peso. Curiosamente, a maior taxa de mortalidade foi a dos animais que receberam tratamento via oral com água destilada, apresentando taxa de mortalidade 87,50%. Já os grupos que receberam o tratamento via oral com etoricoxibe 55,55%.

Os quatro grupos experimentais apresentaram alterações histológicas no tecido cardíaco, caracterizadas por presença de infiltrado inflamatório de células mononucleares (linfócitos) e polimorfonucleares (neutrófilos e macrófagos). Sendo, o infiltrado mais significativo nos grupos que receberam etoricoxibe, tanto em animais do grupo ligadura como os falsos operados. Este resultado, pode sugerir, que a inibição da COX-2 pode exacerbar alterações cardíacas induzidas por isoprenalina em modelos de periodontite.

O diâmetro dos cardiomiócitos das amostras de tecido cardíaco também foi avaliado, o aumento do trabalho imposto ao miocárdio, causado pela injeção de isoprenalina causa depleção das reservas de energia das células musculares cardíacas, o que ocasiona complexas mudanças bioquímicas e estruturais que levam às alterações na permeabilidade da membrana, gerando hipertrofia das células cardíacas (Handforth 1962; Rona 1985). Foi possível observar um maior valor médio do diâmetro dos cardiomiócitos no grupo ligadura + etoricoxibe, sugerindo que este grupo teve os maiores danos cardiovasculares, além disto, durante as análises das lâminas coradas com Tricrômico de Mallory, este mesmo grupo apresentou maior concentração de fibras colágenas.

Segundo Frangogiannis (1978) a necrose do miocárdio torna-se evidente após 24 horas do infarto. Inicialmente, é acompanhada por infiltração neutrofilica e, posteriormente, por infiltrado linfocítico e monocítico. No terceiro dia o acúmulo de colágeno I e III também ocorre na região periférica do infarto e torna-se bem organizado após 14 dias. No presente estudo os animais foram eutanasiados vinte e quatro horas após a segunda dose de Isoprenalina, o que explica a menor quantidade de fibras colágenas observada no tecido cardíaco, quando comparado a estudos como de Ramon em 2011, no qual as análises foram realizadas sessenta dias pós indução de infarto.

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. Devido ao número reduzido da amostra, os resultados são preliminares, sendo necessário a realização de mais estudos utilizando um número maior de animais e comparando diferentes tempos experimentais, para melhor entendimento da relação da doença periodontal e inibidores seletivos de COX-2 com o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

## **8- CONCLUSÕES**

- O grupo Ligadura+etoricoxibe apresentou o maior escore de infiltrado inflamatório presente no tecido cardíaco submetido a isquemia cardíaca induzida por isoprenalina.
- O grupo Ligadura+etorioxibe apresentou a maior quantidade de fibras colágenas no tecido cardíaco submetido a isquemia cardíaca induzida por isoprenalina.
- O grupo Ligadura + etoricoxibe apresentou o maior valor médio de diâmetro dos cardiomiócitos.
- Não houve diferença entre os grupos em relação a perda óssea alveolar média.

Com base nos resultados do presente estudo podemos sugerir que o uso de inibidores seletivos de COX-2, na presença de periododontite, pode exacerbar alterações cardiovasculares.

## 9- REFERÊNCIAS

Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*. 2013;394(1-2):49-54. **(75)**

Acikel M, Buyukokuroglu ME, Erdogan F, Aksoy H, Bozkurt E, Senocak H. Protective effects of dantrolene against myocardial injury induced by isoproterenol in rats: biochemical and histological findings. *Int J Cardiol*. 2005;98(3):389-94. **(101)**

Almeida APCPSC, Fagundes NCF, Maia LC, Lima RR. Is there an association between periodontitis and atherosclerosis in adults: A systematic review. *Current Vascular Pharmacology*. v. 16,n.6,p. 569-582,2017. **(23)**

Antman EM, Bennett JS, Daugherty A, Furberg C, Roberts H, Taubert KA; American Heart Association. Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update for clinicians: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2007 Mar 27;115(12). **(72)**

Aoyama E, Delmão F. Anti-Inflamatórios Não Esteroides (Aines) mais vendidos em Farmácias Comunitárias: Revisão de Literatura. *Rev Bras Interdiscip Saúde — Re BIS*,v.3,n.2, p:29-35, 2021. **(49)**

Arregoces FE, Uriza CL, Porras JV, Camargo MBF, Morales AR. Relation between ultra-sensitive C-reactive protein, diabetes and periodontal disease in patients with and without myocardial infarction. *Arq Bras Endocrinologia Metab*. 2014;58(4):362-68. **(29)**

Asaikumar L, Vennila L, Akila P, Sivasangari S, Kanimozhi K, Premalatha V, Sindhu G. Preventive effect of nerolidol on isoproterenol induced myocardial damage in Wistar rats: Evidences from biochemical and histopathological studies. *Drug Dev Res*. 2019 Sep;80(6):814-823. **(95)**

Azoubel MC, Menezes AM, Bezerra D, Oriá RB, Ribeiro RA, Brito GA. Comparison of etoricoxib and indomethacin for the treatment of experimental periodontitis in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2007 Jan;40(1):117-25. **(45)** Batista RM, Zandonade E, Roelke LH, Emmerich AO, Rosetti EP, Molina MC, NetoETS. Associação entre doença periodontal e aterosclerose subclínica: uma revisão sistemática. *Jornal Vascular Brasileiro* 2011.2011,v.10,n.3],pp.229-238. **(17)**

Batlouni M. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cérebro- vasculares e renais. *Arq Bras Cardiol*, v. 94, n.4, p.556-63,2010. **(59)**

Braghirolli DI. *Farmacologia*. PortoAlegre:SAGAH,2018. **(52)**

Beirão ACTV. *Interações medicamentosas dos AntiInflamatórios não esteroidais (AINES)*. Faculdade de medicina dentária.Universidade do Porto 2016. **(90)**

Bezerra MM, De Lima V, Alencar VBM, Vieira IB, Brito GA, Ribeiro R. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis inrats. *J Periodontol* 2000; 71(6):1009–1014.

Bolla V, Kumari PS, Munnangi SR, Kumar DS, Durgabai Y, Koppolu P. Evaluation of Serum C reactive Protein Levels in Subjects with Aggressive and Chronic Periodontitisin Comparison with Healthy Controls: A Clinico-biochemical Study. *International journal of applied&basic medical research*(2017). **(31)**

Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ. VIGOR Study Group. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med.* 2000 Nov 23;343(21):1520- 8. **(58)**

Capone ML, Tacconelli S, Rodriguez LG, Patrignani P. NSAIDs and cardiovascular disease: transducing human pharmacology results into clinical read-outs in the general population. *Pharmacol Rep.*2010 May-Jun;62(3):530-5. **(70)**

Chahade W, Giorgi RDN, Szajubok JCM. Anti-inflamatórios não hormonais. Einstein, São Paulo, v.6, n.1,p.166-174, 2008. **(66)**

Chandy S, Joseph K, Sankaranarayanan A, Issac A, Babu G, Wilson B, Joseph J. Evaluation of C-Reactive Protein and Fibrinogen in Patients with Chronic and Aggressive Periodontitis: A Clinico-Biochemical Study. J Clin Diagn Res. 2017 Mar;11(3):ZC41-ZC45. **(30)**

Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Effects of Shear Stress on Endothelial Cells: Go with the Flow. Volume 219. Blackwell Publishing Ltd.; Hoboken, NJ, USA:2016.pp. 382–408. Acta Physiologic. **(25)**

Eke PI, Dye BA, Wei L, Slade GD, Thornton-Evans GO, Borgnakke WS. (2015) Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States. Journal of Periodontology, 86, 611-622. **(14)**

Ekuni D, Tomofuji T, Sanbe T, Irie K, Azuma T, Maruyama T, Tamaki N, Murakami J, Koikeguchi S, Yamamoto T. Periodontitis-induced lipid peroxidation in rat descending aorta is involved in the initiation of atherosclerosis. J Periodontol Res. 2009 Aug;44(4):434-42 **(7)**

Emery P. Clinical implications of selective cyclooxygenase-2 inhibition. Scand J Rheumatol Suppl. 1996;102:23-8. **(54)**

Fernandes MI, Gaio EJ, Oppermann RV, Rados PV, Rosing CK. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. Braz. Oral. Res., São Paulo, v. 21, n.3, p.216-221, 2007. **(87)**

Figueredo CM, Lira-Junior R. (2016). Periodontal and inflammatory bowel diseases: Is there evidence of complex pathogenic interactions. *World journal of gastroenterology*, 22(35). **(22)**

Filho HGL, Ferreira NL, Sousa RB, Carvalho ER, Filho JG. Modelo

experimental de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em ratos. Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery, v.26, n.3, p.469-476, 2011. **(94)**

FitzGerald GA and Patrono C. Thecoxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. N.Engl. J.Med.2001;345:433–442. **(46)**

Fitzgerald GA. Coxibs and cardiovascular disease. The New England Journal of Medicine, 2004.351(17),pp.1709-1711. **(69)**

Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schawarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning and functions. Hypertension, 1994; 23(part 2):1121-31. **(39)**

Foudi N, Louedec L, Cachina T, Brink C, Norel X. Selective cyclooxygenase-inhibition directly increases human vascular reactivity to norepinephrine during acute inflammation. Cardiovasc Res, v.81, p.269-277, 2009. **(8)**

Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. Pharmacological Research, 58:88-111, 2008. **(103)**

Fries S, Grosser T. The cardiovascular pharmacology of COX-2 inhibition. Hematology American Society of Hematology Education Program, (2005) pp.445-51. **(68)**

Galvao MP, Chapper A, Rosing CK, Ferreira MB, Souza MA. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. Pesqui Odontol Bras 2003;17:56-62. **(73)**

Ganz P, Vita JA. Testing vasomotor function. Nitric oxide, a multipotent molecule. V.108, p 2049-53. 2003 **(34)**

Garlet GP, Cardoso CR, Silva TA, Ferreira BR, Avila-Campos MJ, Cunha FQ, et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. Oral Microbiol Immunol. 2006;21:12-20. (2), 121–124. **(8)**

Gerzon A, Weissheimer T, Soares N, Pagnoncelli RM, Rosa Ra. Controle farmacológico da dor pós-operatória na odontologia: uma revisão. RSBO Edição Janeiro-Junho 2021. V.18 n.1. **(11)**

Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C, Jr. Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis. *Front Oral Biol.* 2012;15(1):117-32. **(93)**

Grosser T, Fries S, Fitz Gerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest.* 2006 Jan;116(1):4-15. **(57)**

Guarita-Souza LC, Carvalho KA, Rebelatto C, Senegaglia AC, Hansen P, Furuta M. Transplante celular: análise funcional, imunocitoquímica e histopatológica em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células. *Braz.J.Cardiovasc. Surg.* 19(3)Set 2004. **(97)**

Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015 Jan;15(1):30-44. **(21)**

Handforth CP. Isoproterenol-induced myocardial infarction in animals. *Arch Pathol.* 1962 Feb;73:161-5. **(102)**

Hinz B, Renner B, Brune K. Drug insight: cyclo-oxygenase-2 inhibitors – a critical appraisal. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007;3(10):552–60. **(62)**

Hirschfield M, Pepys MB. C-reactive protein: a critical update. *Journal Clin Invest* 2003.111(12):1805. **(28)**

Hoefler R. Inibidores da COX-2 e Riscos Cardiovasculares. *Boletim Farmacoterapêutica*, n. 05, ano 2004. **(60)**

Holmlund A, Lampa E, Lind L. Oral health and cardiovascular disease risk in a cohort

of periodontitis patients. *Atherosclerosis*.v.262,p.101-106.Jul2017**(15)**

Holzhausen M, Rossa Jr. C, Marcantonio Jr. E, Nassar PO, Spolidório DMP, Spolidorio LC. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2002;73:1030-1036. **(10)**

Holzhausen M, Spolidorio DMP, Muscará MN, Hebling J, Spolidorio LC. (2005). Protective effects of etoricoxib, a selective inhibitor of cyclooxygenase- 2, in experimental periodontitis in rats. *Journal of periodontal research*, 40(3), 208-211.**(77)**

Horton R. Vioxx, the implosion of Merck, and aftershocks at the FDA. *Lancet*, London, v. 364, p.1995-1996, 2004.(61)

How KY, Song KP, Chan KG. *Porphyromonas gingivalis*: An overview of Periodontopathic pathogen below the gum line. *Front. Microbiol*.2016;7:53.(13)

Huang H, Geng Q, Yao H, Shen Z, Wu Z, Miao X, Shi P. Protective effect of scutellarin on myocardial infarction induced by isoprenaline in rats. *Iran J Basic Med Sci*. 2018Mar;21(3):267-276.**(79)**

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987 Dec; 84(24):9265-9.**(38)**

Ionel A, Lucaciu O, Bondor C, Moga M, Ilea A, Feurdean C, Campian RS. Assessment of the relationship between periodontal disease and cardiovascular disorders: a questionnaire-based study. *Clujul Medical (1957)* .2016;89(4):534-541.**(18)**

Janket SJ, Baird AE, Chuang SK, Jones JA. Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. *Oral Surg* 2003 May;95(5):559-69.**(5)**

Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, Bissada NF, Bouchard P, Cortellini P, Demirel K, de Sanctis M, Ercoli C, Fan J, Geurs NC, Hughes FJ, Jin L, Kantarci A, Lalla E, Madianos PN, Matthews D, McGuire MK, Mills MP, Preshaw PM, Reynolds MA, Sculean A, Susin

C, West NX, Yamazaki K. Periodontal manifestations of systemic diseases and development alandac quired conditions: Consensus report of work group 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of clinical periodontology*, v. 45, p. S219-S229, 2018**(1)**

Kaschwich M, Behrendt CA, Heydecke G, Bayer A, Debus ES, Seedorf U, Aarabi G. The Association of Periodontitis and Peripheral Arterial Occlusive Disease- A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 15;20(12):2936. **(22)**

Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *JDent Res*. 2014 Nov;93(11):1045-53. **(2)**

Kebschull M, Demmer RT, Papapanou PN. "Gumbug, leave my heart alone!"— epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *JDent Res*. 2010 Sep;89(9):879-902. **(33)**

Kim SE, Lee ER, Lee Y, Jeong M, Park YM, Ahn JS, Ahn JT, Seo K. An modified method for inducing periodontitis in dogs using a silk-wire twisted ligature. *Journal of Veterinary Science*, v. 13, n.2, p.193-197, 2012. **(86)**

Kingwell BA. Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. *FASEBJ*. 2000;14:1685-96. **(41)**

Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *JPeriodontol*. 1991;62:59–73. **(80)**

Klein DC, Raisz LG. Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 1970; 86: 1436-1440. **(47)**

Kulińska-Michalska M, Lewkowicz N. Periodontitis as a risk factor of stroke-literature review. *MedOgNaukZdr*. 2017; 23(2): 138–142. **(24)**

Lima JCC, Silva AMS, Lima DS. A Proteína C reativa como marcador de risco de doença cardiovascular. *Atheros* 2002;13 (1):20-22. **(27)**

Lima LVR, França JVEL, Mapurunga BPR, Batista SIS, Mendes IC, Barreto IL, Cruz VMS, Silva BR. Doença periodontal como fator de risco para mudanças cardiovasculares: Uma análise da literatura. *Brazilian Journal of Health Review*,3(3):4370-4382.(16)

Lipsky PE, Brooks P, Crofford LJ, DuBois R, Graham D, Simon LS, van de Putte LB, Abramson SB. Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease. *Arch Intern Med*.2000Apr10;160(7):913-20.(44)

Lira-Junior R, Figueredo CM. Periodontal and inflammatory bowel diseases: Is there evidence of complex pathogenic interactions. *World J Gastroenterol*, v. 22, n. 35, p.7963-7972,2016. (12)

Lopes DAC, Dorado SHA, Alves SH, NardinoRB..Anti-inflamatórios não esteroidais(AINES): Mecanismos farmacológicos, emprego terapêutico e os seus riscos à saúde. *Revista Mostra Científica da Ajes*,3ªed,016.(48) Luscher TF, Seo B, Buhler FR. Potential role of endothelin in hypertension. *V*,21, p- 752-57,1993 (36)

Ma S, Guo J, You X, Xia W, Yan F. Expressions of interleukin-1 beta and interleukin-6 with in aortas and uterine frats with severities of ligature-induced periodontitis. *Inflammations*. v.34,p.260-268, 2011.(89)

Machado WM, Prestes AP, Costa TP, Mendes RT, Olchanheski LR Jr, Sordi R, Otuki MF, Fávero GM, Velloso JC, Santos FA, Fernandes D. The effect of simvastatin on systemic inflammation and endothelial dysfunction induced by periodontitis. *J Periodontal Res*.2014Oct;49(5):634-41.(37)

Masthan MK, Anitha N, Jacobina JJ, Babu NA. Oral Infections Causing Systemic Diseases. *Biomed Pharmacol J*2016;9. (3).

Mehta RH, Rathore SS, Radford MJ, Wang Y, Krumholz HM. Acute myocardial infarction in the elderly: differences by age. *J Am Coll Cardiol*.2001Sep;38(3):736-41.(26)

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. **(65)**

Mendes RT, Stanczyk CP, Sordi R, Otuki MF, Santos FA, Fernandes D. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. Revista Brasileira de Reumatologia. 2012, v.52, n.5, pp.774-782. **(64)**

Mendis S, Puska P, Norrving B. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control/edited by: Shanthi Mendis. World Health Organization (WHO) 2011. **(18)**

Mitchell JA. Selectivity of non steroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. Proc Natl Acad Sci USA v. 90, n. 24, p.1193-1197, 1993. **(71)**

Mitchell JA, Warner TD. COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Nat Rev Drug Discov, v. 5, n. 1, p.75-86, jan 2006. **(67)**

Morton RS, Dongari-Bagtzoglou AI. Cyclooxygenase-2 is upregulated in inflamed gingival tissues. J. Periodontol., Chicago, v.72, n.4, p.461-469, Apr. 2001. **(43)**

Oliveira MMC, Silva MM, Moreira TL, Couto VF, Coelho YN, Nunes CP. O Uso Crônico de Anti-Inflamatórios não esteroidais e seus efeitos adversos. Revista Caderno de Medicina, v.2, n.2, 2019. **(53)**

Orlyvardeny P, Scott D, Solomon MD. Cyclooxygenase-2 inhibitors, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and cardiovascular risk. Cardiology Clinics, 2008, 26:589-601. **(56)**

Patrignani P, Tacconelli S, Sciulli MG, Capone ML. New insights into COX-2 biology and inhibition. Brain Res Rev 2005; 48(2):352. **(63)**

Prince PS, Dhanasekar K, Rajakumar S. Preventive effects of vanillic acid on lipids, bax, bcl-2 and myocardial infarct size on isoproterenol-induced myocardial infarcted rats: a biochemical and invitro study. *Cardiovasc Toxicol.*2011;11(1):58-66.**(98)**

Ramirez J, Arce RM, Contreras A. Periodontal treatment effects on endothelial function and cardiovascular disease biomarkers in subjects with chronic periodontitis: protocol for a randomized clinical trial. *12;46; 2011.***(35)**

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.**(104)**

Resolução-RDC79, de 4 de novembro de 2008. Diário Oficial da União de 05/11/08. N.215 seção1.**(91)**

Rona G. Catecholamine cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol.*1985Apr;17(4):291-306.**(78)**

Sallay K, Sanavi F, Ring I, Pham P, Behling UH, Nowotny A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *J Periodontal Res* 1982;17:263-274.**(74)**

Salvi GE, Williams RC, Offenbacher S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as adjuncts in the management of periodontal diseases and peri-implantitis. *Curr Opin Periodontol.*1997;4:51-8.**(50)**

Sanz M, D'Aiuto F, Deanfield J, Fernandez-Avilés F. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease—scientific evidence on the association between periodontal and cardiovascular diseases: a review of the literature. *European Heart Journal Supplements*, Volume 12, Issue suppl\_B, April 2010, Pages B3–B12.**(4)**

Saxena AK, Ramachandran R, Gulati M, Kumar M. Cyclooxygenase-2 inhibitors in postoperative pain and chronic pain management: Current opinions and future perspectives. *Indian J Anesth*2005;49(3):170–179.**(92)**

Semenoff SA, Bosco ÁF, Semenoff TDV, Buzelle SL, Ribeiro RV, Jardim Júnior EG. Dois métodos histométricos distintos comparativos de periodontite induzida em ratos. (2006) *Periodontia*,5-11. **(88)**

Senthil S, Sridevi M, Pugalendi V. Cardioprotective effect of oleanolic acid on isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. *Toxicologic Pathology*,v.35,p.418-23,2007. **(100)**

Sfyroeras GS, Roussas N, Saleptsis VG, Argyriou C, Giannoukas AD. Association between periodontal disease and stroke. *J Vasc Surg*. 2012Apr;55(4):1178-84. **(6)**

Silva LS, Castro Bueno RGP, Freitas RMC, Maciel MSP, Marcelino TP. Incidência da auto medicação no uso indiscriminado de anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais entre universitários de Imperatriz-MA. *Braz.J.Hea.Rev.*,Curitiba,v.2,n.2,p. 862-887, 2019. **(51)**

Skoog T, Dichtl W, Boquist S, Skoglund-Andersson C, Karpe F, Tang . Systematic review an dmeta-regression. *Journal of dental research*, v.93, n.11, p.1045-1053,201. **(32)**

Socranski SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*. 2005;38:135–187. **(20)**

Song YH,Cai H,Gu N, Qian CF,Cao SP, Zhao ZM. Icariin attenuates cardiac remodeling throughdown-regulating myocardial apoptosis and matrixmetalloproteinase activity in rats with congestive heart failure. *The Journal of pharmacy and pharmacology*,v. 63, n.4,p.541-9, 2011. **(99)**

Steffens JP, Santos FA, Sartori R, Pilatti GL(2010), Preemptive Dexamethasone and Etoricoxib for Pain and Discomfort Prevention After Periodontal Surgery: A Double-Masked, Crossover, Controlled Clinical Trial. *Journal of Periodontology*,81:1153-1160. **(10)**

Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental Animal Models in Periodontology: A Review. *The Open Dentistry Journal*. 2010;4:37-47. **(76)**

Swerts AA. Ação da laser terapia na periodontite experimental induzida em ratos tratados com sinvastatina: estudo bioquímico e radiográfico. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Alfenas, 2014. **(84)**

Tang EH, Vanhoutte PM. Prostanoids and reactive oxygen species: team players in endothelium-dependent contractions. *Pharmacol Ther*. 2009;122(2):140-9. **(42)**

Tavares TIA. Riscos e benefícios dos anti-inflamatórios não esteróides inibidores seletivos da ciclo-oxigenase 2. Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde. Porto, 2012. **(62)**

Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018 Jun;89 Suppl 1:S159-S172. **(82)**

Tsioufis C, Kasiakogias A, Thomopoulos C, Stefanadis C. Periodontitis and blood pressure: the concept of dental hypertension. *Atherosclerosis*. 2011 Nov; 219(1):1- 9. **(83)**

Whelton A. Renal aspects of treatment with conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs versus cyclooxygenase-2 specific inhibitors. *American Journal of Medicine*, 2001,110:33-42. **(55)**

William TJ, Peck MJ. Role of prostaglandin-mediated vasodilation in inflammation. *Nature*. v.270, n.5637, p.530-2, 1977. **(9)**

Wu QQ, Xiao YM, Yuan Y, Ma ZG, Liao HH, Liu C. Mechanisms contributing to cardiac remodelling. *Clin Sci*. v.131, n.18, p.2319–45, 2017. **(81)**

Yang Y, Loscalzo J. Regulation of tissue factor expression in human microvascular endothelial cells by nitric oxide. *V*. 101, p2144-149, 2000. **(40)**

Zhou W, Benharash P, Chua JH, Nakahara S, Ho JK, Mahajan A. Acute Effects of Pacing at Different Ventricular Sites on Left Ventricular Rotational Mechanics in a Porcine Model. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2015 Oct;29(5): 1148-54. **(96)**APÊNDICE

# APÊNDICE

## -Apêndice1



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 22<sup>nd</sup> 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 Onuki, Daniel Fernandes, Regina de Sordi, Mariana Oliveira, Alana Gabrielli Vouk, 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 [aqui](#) informando o código verificador **2410286** e o código CRC **CBEEE78B**.