

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Rodrigo Dalla Pria Balejo

**EFEITO DA INIBIÇÃO DE TRIPTASE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL
INDUZIDA EM RATOS**

TAUBATÉ – SP
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Rodrigo Dalla Pria Balejo

**EFEITO DA INIBIÇÃO DE TRIPTASE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE DOENÇA PERIODONTAL
INDUZIDA EM RATOS**

Dissertação apresentada para obtenção do
Título de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Odontologia do Departamento de
Odontologia da Universidade de Taubaté.
Área de Concentração: Periodontia
Orientadora: Profa. Dra. Marinella Holzhausen
Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto Cortelli

Taubaté – SP
2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo
Sibi – Sistema Integrado de Bibliotecas / UNITAU**

B183e Balejo, Rodrigo Dalla Pria
Efeito da Inibição de triptase sobre o desenvolvimento de doença
periodontal induzida em ratos / Rodrigo Dalla Pria Balejo. – 2009.
48f.:il.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Taubaté, Programa de Pós-
graduação em Odontologia, 2009.

Orientação: Profa. Dra. Marinella Holzhausen, Departamento de
Odontologia.

Co-orientação: Prof. Dr. José Roberto Cortelli, Departamento de
Odontologia.

1. Triptase. 2. Doença periodontal. 3. Perda óssea alveolar. I. Título.

RODRIGO DALLA PRIA BALEJO

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. _____ UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ

Assinatura _____

Prof.Dr. _____ UNIVERSIDADE

Assinatura _____

Prof.Dr. _____ UNIVERSIDADE

Assinatura _____

Dedico este trabalho a minha esposa Christiane,

Aos meus pais, Jaime e Marlene

AGRADECIMENTOS

A minha esposa, Christiane, que esteve ao meu lado em todos os momentos, me incentivando para o meu sucesso;

Aos meus pais Jaime e Marlene, que sempre estiveram me apoiando, e se dedicando para a minha vitória;

A minha irmã Karina e meu cunhado Daniel, e minha afilhada Beatriz. Muito Obrigado;

A minha família, tias e tios, primos e primas, que sempre se alegraram com minhas conquistas.

Ao meu tio Sérgio e tia Elenice, primos, primas e toda família. Muito obrigado por sempre estarem me auxiliando com muito carinho em tudo que precisei em todos os momentos;

A minha prima Daiene, Mateus e João. Obrigado por também participarem em mais este momento de minha vida, oferecendo-me apoio;

A minha sogra Maria Oneida, meus cunhados e esposas, as tias Maria Regina e família e Maria de Lourdes e família. Muito obrigado por terem me apoiado;

A minha orientadora Profa. Dra. Marinella Holzhausen que me ensinou o caminho da ciência, sempre com muita paciência, incentivo, exigência, competência e dedicação, demonstrando toda sua sabedoria na construção de meu aprendizado. Obrigado por fazer parte desta nossa conquista;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. José Roberto Cortelli que aceitou participar do desenvolvimento deste trabalho, contribuindo ao crescimento com sua competência;

A Profa. Dra. Sheila Cavalca Cortelli, coordenadora da área de Periodontia, e a Coordenadora do programa de Mestrado e Doutorado em Odontologia Profa. Dra. Chistina Claro Neves;

A Adriana Peloggia e demais funcionários da secretaria de pós-graduação da Odontologia, por sempre serem atenciosos;

A todos os Professores que fizeram parte desta minha formação, Ana Christina Neves, Ana Lia Anbinder, Denise Raldi, Laís Concílio, Leonardo Cunha, Marcos Augusto do Rego, Maria Rozeli Quirino, Mariella Leão, Priscila Liporoni, Sandra Habitante, Silvana Soléo, Vanessa Gobbo, Wilson Saad, Maximiliano Neisser, Edna Chamon e Celso Queiroz.

Ao Prof. Dr. Wilson Saad, por ter cedido o laboratório de Fisiologia, e as técnicas do laboratório Gilmara e Adriana, por serem muito atenciosas e fornecerem todo o suporte quando da realização do experimento;

Ao acadêmico e agora colega Guilherme Lara, por ter participado e auxiliado em muitas horas no desenvolvimento de todo o experimento;

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues, do laboratório de Bioquímica da UNITAU, por ter cedido o laboratório e equipamentos para o experimento;

Ao senhor Agnaldo Gonçalves Rosa, Supervisor de Seção do Biotério Central-UNESP- Botucatu, por toda disponibilidade e atenção quando do fornecimento dos animais para o experimento;

Aos queridos professores da Periodontia, Profa Dra. Marinella Holzhausen, Prof. Dr. José Roberto Cortelli, Profa Dra Débora Pallos e Profa. Dra. Lucilene Hernandes Ricardo, muito obrigado por serem sempre atenciosos, dedicados e por possibilitarem o mais profundo conhecimento desta ciência;

Ao Prof. Dr. Gilson César Nobre Franco, por me ensinar tudo que a Biologia Molecular é, e por sempre ter auxiliado com muitas orientações, demonstrando amizade e alegria nos diversos momentos;

E aos queridos colegas do curso, Caroline, Lilibeth, Patrícia, Adriana, Zilla, Juliana, Mariana, Marília, Altino, Paulo, Esdras, Cláudio, obrigado pela amizade;

E em especial aos colegas Alexandre e Manuel, pela fraternidade que conquistamos.

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo....qualquer um pode recomeçar e fazer um novo fim." (Chico Xavier)

Balejo RDP. Efeito da inibição de triptase sobre o desenvolvimento de doença periodontal induzida em ratos [Dissertação de mestrado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2009. 48p.

RESUMO

Objetivos: Avaliar o efeito da inibição de triptase, com o uso da droga nafamostatate mesilate (NM), sobre o desenvolvimento de doença periodontal induzida em ratos. **Metodologia:** Oitenta ratos Wistar machos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos. Um grupo controle com injeção diária de NaCl 0,9%, grupo NM (injeção diária de 0.1mg/kg de NM, ip), grupo ligadura (colocada ao redor do primeiro molar inferior direito), e grupo NM + Ligadura. A quantidade de perda óssea alveolar (POA) na porção mesial da face lingual da raiz méso-lingual do primeiro molar inferior foi determinada após o sacrifício aos sete e 14 dias com o auxílio de um estereomicroscópio, e a atividade de mieloperoxidase (MPO) foi analisada nos tecidos gengivais. **Resultados:** A inibição da triptase levou à diminuição significativa ($p < 0,05$) de POA em animais submetidos à ligadura e periodontite induzida. A inibição da triptase pelo NM não apenas preveniu o início da POA aos sete dias de experimento ($0,44\text{mm} \pm 0,16$ e $0,60\text{mm} \pm 0,22$, $p < 0,05$, NM + Ligadura versus Controle), como também diminuiu significativamente a POA aos 14 dias ($0,97\text{mm} \pm 0,17$ versus $1,82\text{mm} \pm 0,26$, $p < 0,001$, NM + Ligadura versus Ligadura). Além disso, a inibição da triptase diminuiu significativamente a atividade de MPO aos 14 dias ($p < 0,05$). **Conclusão:** Os dados do presente estudo sugerem que a inibição da triptase modificou a progressão da periodontite induzida experimentalmente em ratos.

Palavras-chave: Triptase; Doença periodontal; Perda óssea alveolar.

Balejo RDP. Effect of tryptase inhibition on the development of periodontal disease in rats [Dissertação de mestrado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2009. 48p.

ABSTRACT

Aim: To evaluate the effect of inhibition of tryptase, with the drug nafamostat mesylate (NM) on the development of periodontal disease induced in rats. **Methodology:** Eighty (80) male Wistar rats were randomly separated into four study groups as follows: saline Control group, NM group (daily injection of 0.1mg/kg body weight of NM, i.p.), Ligature group (ligature placed at the gingival margin level of lower right first molars), and NM + Ligature group. The amount of alveolar bone loss (ABL) around the mesial root surface of the first mandibular molar was determined at sacrifice at seven and 14 days with the aid of a stereomicroscope, and the myeloperoxidase activity (MPO) was analyzed at the gingival tissues. **Results:** NM led to significantly ($p < 0.05$) decreased ABL in animals subjected to ligature induced periodontitis. Tryptase inhibition not only prevented the onset of significant ABL at seven days of the experiment (0.44 ± 0.16 and 0.60 ± 0.22 , $p > 0.05$, NM+Ligature and Control, respectively) but also significantly decreased the ABL when compared with the Ligature group at 14 days (0.97 ± 0.17 versus 1.82 ± 0.26 , $p < 0.001$). In addition, NM significantly decreased MPO activity at 14 days ($p < 0.05$). **Conclusion:** These data provide evidence that tryptase inhibition may modify the progression of experimentally induced periodontitis in rats.

Keywords: Tryptase; Periodontal disease; Alveolar bone loss.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo patogênico proposto	14
Figura 2 – Foto por vista oclusal mostrando ligadura em primeiro molar inferior, imediatamente após sacrifício aos sete dias do experimento	32
Figura 3 – Foto por vista lingual mostrando ligadura em primeiro molar inferior, imediatamente após sacrifício aos 14 dias do experimento	33
Figura 4 – Foto realizada com auxílio de um estéreo-microscópio, aumento 10x mostrando primeiro molar inferior direito de animal pertencente ao grupo controle no início do experimento	36
Figura 5 – Foto realizada com auxílio de um estereomicroscópio, aumento 10x mostrando primeiro molar grupo ligadura aos sete dias, onde observa-se área mesial com perda óssea	37
Figura 6 – Perda óssea alveolar média nos diferentes grupos de tratamento, sendo que (*) significa que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle; (#) significa que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação grupo com ligadura no mesmo período (sete ou 14 dias) e (•) significa que há diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao período de sete dias em mesmo grupo de tratamento experimental	38
Figura 7 – Atividade MPO média, sendo que (*) significa que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle; (#) significa que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação grupo com ligadura no mesmo período (sete ou 14 dias) e (•) significa que há diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao período de sete dias em mesmo grupo experimental	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 PAPEL DA TRIPTASE NA DOENÇA INFLAMATÓRIA CRÔNICA	15
2.2 PAPEL DA TRIPTASE NA DOENÇA PERIODONTAL	22
2.3 EFEITO DA INIBIÇÃO DE TRIPTASE, COM O NAFAMOSTATE MESILATE, SOBRE A DOENÇA INFLAMATÓRIA	25
3 PROPOSIÇÃO	30
3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1	30
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 2	30
4 MÉTODO	31
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	31
4.2 ANIMAIS	31
4.3 PROTOCOLO DA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL	31
4.4 ADMINISTRAÇÃO DE INIBIDOR ESPECÍFICO DE TRIPTASE	33
4.5 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO)	34
4.6 MENSURAÇÃO DE PERDA ÓSSEA ALVEOLAR	34
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	
5 RESULTADOS	36
5.1 ANÁLISE DE PERDA ÓSSEA ALVEOLAR	
5.2 ANÁLISE DE ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE	38
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO	49

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é a mais importante causa de perda dental em adultos. Embora multifatorial, a patogênese da doença periodontal envolve a presença de um biofilme bacteriano, que inicia uma reação inflamatória local em um hospedeiro predisposto, resultando em destruição tecidual e perda de osso alveolar (Schenkein, 2006). Inúmeras células e seus mediadores orquestram o organizado e complexo sistema imune periodontal durante o processo inflamatório (Schwartz et al., 1997).

Em todas as cascatas inflamatórias da doença periodontal existem algumas etapas mediadas por enzimas proteolíticas. Na realidade, altos níveis de atividade proteolítica têm sido encontrados no fluido gengival de bolsas periodontais, onde uma mistura de enzimas endógenas do hospedeiro e proteases bacterianas combinam-se para mediar a degradação do tecido conjuntivo (Reynolds & Meikle, 1997). Dentre as enzimas do hospedeiro, destacam-se as serina-proteases como tripsina, elastase, plasmina, enzimas do complemento e a triptase (Embery & Waddington, 1994; Loos & Tjoa, 2005).

A triptase é uma serina protease armazenada principalmente pelos grânulos dos mastócitos encontrados na maioria dos tecidos, especialmente no epitélio e conjuntivo gengival (Steinsvoll et al., 2004). Os mastócitos são encontrados no tecido conjuntivo e epitelial da gengiva (Lin & Befus, 1999; Steinsvoll et al., 1999). Números mais elevados de mastócitos têm sido encontrados no tecido gengival inflamado de pacientes com periodontite quando comparados aos níveis encontrados na gengiva de pacientes periodontalmente saudáveis (Gunhan et al., 1991; Kennet et al., 1993; Steinsvoll et al., 1999). Sabe-se que quando ativados por

citocinas ou produtos bacterianos, os mastócitos sofrem degranulação e liberam triptase e outros mediadores de condições alérgicas e inflamatórias (Steinvoll et al., 2004). Na realidade, um aumento de atividade proteolítica tipo triptase no fluido crevicular de pacientes com periodontite crônica correlaciona-se positivamente com severidade da perda de inserção clínica e reabsorção óssea (Cox & Eley, 1989; Eley & Cox, 1990; Eley & Cox, 1992a). Ainda, uma redução dos parâmetros clínicos após terapia periodontal leva a uma redução significativa dos níveis de atividade da triptase presente no fluido crevicular (Eley & Cox, 1992b).

O envolvimento da triptase na resposta imune inata tem sido demonstrado em algumas formas de doenças inflamatórias crônicas, tais como artrite reumatóide (Nakano et al., 2007) e doenças inflamatórias intestinais (Yoshida et al., 2006). Sabe-se que a triptase induz o extravazamento microvascular (He & Walls, 1997) e a quimiotaxia de células inflamatórias (He et al., 1997), além de aumentar a expressão da ciclooxigenase-2 (Frungeri et al., 2002), estimular a síntese de mediadores pró-inflamatórios, tais como as prostaglandinas e a interleucina-8 (Steinsvoll et al., 2004) e ativar a matriz metaloproteinase-2 (Lohi et al., 1992), todos mediadores reconhecidos da destruição tecidual. Além disso, a terapia anti-triptase, através da administração de nafamostat mesilate, o mais potente inibidor da triptase, tem se mostrado efetiva na terapia da doença intestinal inflamatória na colite experimental em ratos (Isozaki et al., 2006; Yoshida et al., 2006).

A importância da triptase como molécula efetora essencial da resposta imune em diversas doenças inflamatórias, além de sua presença no fluido crevicular e em homogenatos de tecidos gengivais inflamados, sugerem um possível papel desta enzima na patogênese da doença periodontal crônica. No entanto, a significância biológica desta protease do hospedeiro na destruição periodontal

permanece desconhecida até o momento. No presente estudo, nós hipotetizamos que a triptase desempenha um papel fundamental na progressão da doença periodontal. Desta forma, o objetivo principal do presente estudo foi avaliar o efeito da inibição de triptase, com o uso da droga nafamostatate mesilate, sobre o desenvolvimento de doença periodontal induzida por ligadura em ratos.

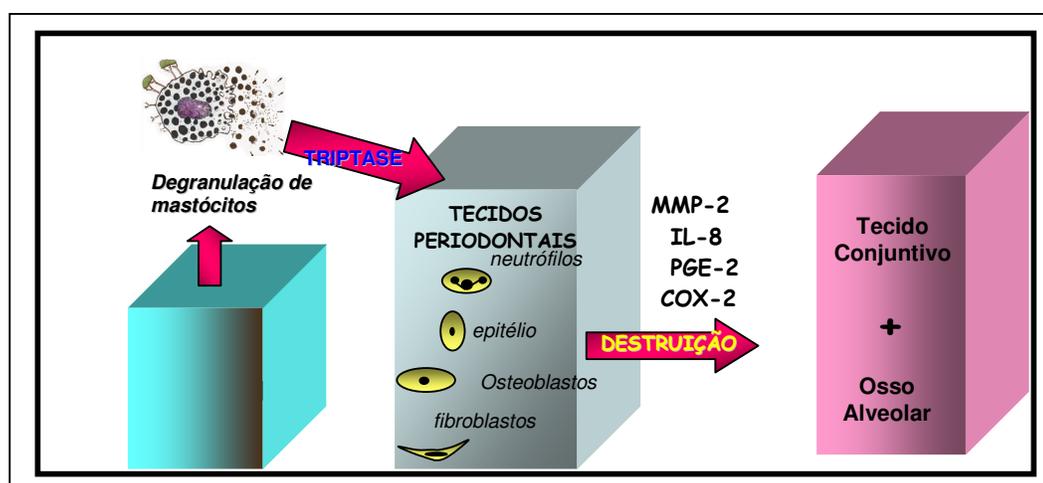


Figura 1 - Modelo patogênico proposto: nós hipotetizamos que a triptase, liberada após a ativação dos mastócitos por ação de citocinas ou produtos do biofilme bacteriano, pode desempenhar um papel fundamental na patogênese da doença periodontal, induzindo ao aumento de expressão da COX-2, síntese de PGE-2 e IL-8 e ativação de MMP-2, todos mediadores reconhecidos da destruição tecidual

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PAPEL DA TRIPTASE NA DOENÇA INFLAMATÓRIA CRÔNICA

Bischoff et al. (1996) avaliaram a frequência de mastócitos em biópsias intestinais de pacientes com doença inflamatória. A quantidade de mastócitos foi avaliada imunohistoquimicamente em biópsias de pacientes com doença de Crohn (33 casos) ou colite ulcerativa (31 casos) e em 29 pacientes controle. Os autores demonstraram que não houve diferença significativa quanto ao número de mastócitos em pacientes com doença intestinal inflamatória e pacientes controle. Na realidade o número de mastócito encontrou-se reduzido em áreas teciduais com inflamação ativa ($143 \pm 16/\text{mm}^2$, versus $206 \pm 18/\text{mm}^2$ em tecidos não inflamados). Segundo os autores, a explicação sugerida para o reduzido número de mastócitos é a ocorrência de degranulação de mastócitos.

Sepper et al. (1998) avaliaram o papel dos mastócitos na inflamação crônica inflamatória severa da bronquioestasia através da mensuração dos níveis de triptase derivada de mastócitos presentes no fluido bronquioalveolar e em amostras de tecido pulmonar, e análise da atividade tipo triptase em 36 pacientes com bronquioestasia e em 14 pacientes controle. As concentrações de triptase no fluido bronquioalveolar foram maiores ($P < 0,01$) em pacientes com bronquioestasia ($4,7\mu\text{g/L}$) em comparação com os controles ($2,0\mu\text{g/L}$). A atividade tipo triptase foi significativamente maior ($P < 0,0001$) em pacientes com bronquioestasia (174nmol/L) em relação ao controle saudável (28nmol/L). A presença de mastócitos degranulados foi significativamente maior em tecido pulmonar da bronquioestasia. Os autores sugerem que a forte correlação entre os níveis de triptase e a severidade

da doença possa estar envolvida com a reação inflamatória na bronquioestasia pulmonar.

Matsunaga & Terada (2000) investigaram a presença de mastócitos positivos para triptase no fígado de pacientes com doenças hepatobiliares. Os autores avaliaram imunohistoquimicamente a presença de mastócitos em 13 fígados normais e em 193 biópsias de fígado de pacientes com cirrose biliar primária (n=43), hepatite autoimune (n=11), hepatite B crônica (n=37), hepatite C crônica (n=41), doença de fígado causada por alcoolismo (n=40) e hepatolitíase (n=21). A densidade de mastócitos por mm² de estroma foi baixa em fígado normal, mas alta em doenças crônicas do fígado e correlacionou-se positivamente com o grau de fibrose.

Xiong et al. (2000) estudaram o envolvimento de mastócitos na inflamação de apêndices. Mastócitos positivos para a triptase foram avaliados imunohistoquimicamente em apêndices removidos cirurgicamente em vinte crianças com apendicite aguda histologicamente comprovada, dez apêndices normais de pacientes com diagnóstico clínico de apendicite e dez apêndices normais de pacientes submetidos à cirurgia abdominal eletiva. Um número significativamente maior de mastócitos positivos para a triptase ($P < 0.05$) estava presente em amostras de pacientes com apendicite em comparação com amostras de tecidos controle. Os autores sugerem um papel importante para os mastócitos no processo patofisiológico que leva à apendicite aguda.

Roberts & Brenchley (2000) investigaram o número de mastócitos em rins fibróticos e em rins normais, uma vez que os mastócitos, quando ativados podem levar à secreção de inúmeros fatores fibrogênicos e têm sido associados ao desenvolvimento de condições fibróticas no fígado, pulmão e na pele. Os mastócitos

foram quantificados imunohistoquimicamente (anticorpo anti-triptase) em transplantados renais mostrando rejeição aguda e crônica e toxicidade à ciclosporina, em rins removidos por pielonefrite crônica e biópsias renais de pacientes com nefropatia IgA, nefropatia membranosa e nefropatia decorrente do diabetes. Os mastócitos estavam ausentes ou em pequeno número no rim normal (1.6/mm²), mas numerosos nas biópsias que demonstraram fibrose: nefropatia membranosa (21.7/mm²), nefropatia do diabetes (29.2/mm²), na rejeição crônica de transplantes renais (27.1/mm²) e na toxicidade crônica à ciclosporina (1.6/mm²). Na maioria dos casos, os mastócitos apresentaram-se degranulados. Os autores concluíram que o aumento no número de mastócitos é uma característica consistente com a fibrose renal, sugerindo um importante papel patogênico para os mastócitos no processo fibrótico.

Esposito et al. (2001) avaliaram o número e a distribuição de mastócitos em 46 biópsias de pacientes com pancreatite crônica e em 12 biópsias de pacientes saudáveis. Além disso, este estudo avaliou a presença de fator de células tronco, o mais importante fator de crescimento de mastócitos, e de seu receptor, c-kit. Os mastócitos foram encontrados tanto em áreas fibróticas quanto no parênquima acinar residual em amostras de pancreatite crônica. O número total de mastócitos foi significativamente maior na pancreatite crônica em relação ao pâncreas normal ($P < 0.001$) e correlacionou-se positivamente com a extensão da fibrose e com a intensidade da inflamação. Ainda, o fator de crescimento de mastócitos e o receptor c-Kit encontraram-se localizados principalmente em tecidos fibróticos, sugerindo que os mastócitos são um relevante componente do infiltrado inflamatório responsável pela destruição tecidual e remodelação na pancreatite crônica.

Nishida et al. (2002) compararam a distribuição de mastócitos e macrófagos na mucosa do cólon de pacientes com colite colagenolítica (n=13), doença de Crohn (n=20), colite ulcerativa (n=20) e pacientes controle (n=20). A análise imunohistoquímica através de anticorpos para triptase e CD68 demonstrou que o número de mastócitos e de macrófagos foi maior na colite colagenolítica ($286 \pm 89/\text{mm}^2$), doença de Crohn ($330 \pm 84/\text{mm}^2$) e colite ulcerativa ($355 \pm 90/\text{mm}^2$) em relação ao controle ($201 \pm 44/\text{mm}^2$). Os autores sugerem que os mastócitos na mucosa podem ser associados ao desenvolvimento de colite colagenolítica e de doença inflamatória intestinal.

Stoyanova & Gulubova (2002) avaliaram o papel da triptase do mastócito e de estruturas neuronais na regulação das respostas inflamatórias e imunes na doença inflamatória intestinal. Biópsias de parede intestinal de seis pacientes com colite ulcerativa crônica e de seis pacientes com carcinoma retal (controle) foram avaliadas imunohistoquimicamente quanto a presença de fibras nervosas e de células contendo substância P e triptase. Mastócitos imunopositivos para triptase e substância P foram encontrados em maior número na colite ulcerativa em relação as amostras controle. Os autores concluíram que as interações entre elementos neuronais e mastócitos desempenham um significativo papel na progressão e manutenção de processos inflamatórios que acompanham a colite ulcerativa crônica.

Solari et al. (2004) investigaram o papel do mastócito no processo fibrótico intersticial em rins com nefropatia de refluxo, uma vez que o mastócito é sabidamente um importante secretor de fatores fibrogênicos associados com o depósito de tecido fibroso que acompanha o processo inflamatório crônico. Amostras de rins obtidas durante a nefrotomia de 12 pacientes (dois a 13 anos de idade) com nefropatia severa e cinco amostras controle foram examinadas

imunohistoquimicamente com anticorpos anti-triptase. Os autores demonstraram um aumento significativamente maior de infiltrado de mastócitos em amostras de nefropatia (14.2+/-9.6) comparado as amostras controle (1.3 +/- 0.8), (P < 0.05). Além disso, o número de mastócitos infiltrados positivos para triptase correlacionou-se com o grau de fibrose intersticial de mastócitos na nefropatia de refluxo, sugerindo o envolvimento da triptase dos mastócitos no desenvolvimento de fibrose na nefropatia de refluxo.

Kinoshita et al. (2005) estudaram o papel dos mastócitos como ativadores de células endoteliais na patogênese da inflamação crônica. Células epiteliais oriundas de veias do cordão umbilical humano foram estimuladas com grânulos de mastócitos preparados de mastócitos leucêmicos humanos. O sobrenadante e o RNA total das células foram coletados. Os níveis de interleucina 1 beta, fator de necrose tumoral alfa e fator estimulador de granulócitos permaneceram inalterados por 24 horas. Contrariamente, os níveis de proteína-1 quimiotrativa de monócitos (MCP-1) e de interleucina-8 aumentaram significativamente dentro de seis horas. A indução dessas quimiocinas foi atenuada por anticorpo neutralizador anti-triptase. Além disso, MCP-1 e IL-8 foram induzidos em células epiteliais pela incubação com triptase de mastócitos humanos. Estes resultados indicam que a produção de MCP-1 e IL-8 em células epiteliais por grânulos de mastócitos é amplificada pela triptase.

Iosub et al. (2006) avaliaram o papel da triptase do mastócito e do receptor tipo 2 ativado por protease (PAR₂) no desenvolvimento e progressão da inflamação testicular. Na orquite induzida experimentalmente, houve uma hiper expressão de PAR₂, detectado imunohistoquimicamente em macrófagos e células peritubulares, e um aumento no número de mastócitos degranulados. Além disso, os autores demonstraram que após a injeção de triptase recombinante, houve um aumento da

expressão de citocinas e mediadores inflamatórios, tais como, fator de crescimento tecidual beta (TGF- β) e de cicloxigenase 2 (COX-2). Os autores sugerem que a ativação do PAR₂ pela triptase do mastócito contribui para a inflamação testicular e pode constituir-se em um mecanismo patogênico da orquite autoimune.

Jakate et al. (2006) avaliaram a concentração de mastócitos em biópsias do cólon intestinal ou do duodeno de paciente com diarréia crônica resistente ao tratamento. A análise imunohistoquímica da triptase do mastócito foi realizada em biópsia de 47 pacientes com diarréia crônica não tratável, cinquenta pacientes controle e 63 pacientes com outros tipos de doenças que causam diarréia (inflamação crônica intestinal, colite colagenolítica e colite linfocítica). Setenta por cento dos pacientes com diarréia crônica intratável apresentaram mais do que vinte mastócitos por análise de campo. Pacientes controle e pacientes com outros tipos de diarréia apresentaram 13.3 +/- 3.5 mastócitos. Os autores concluíram que o aumento de mastócitos pode ser demonstrado por imunohistoquímica através da triptase do mastócito, e sugerem que um novo termo, enterocolite do mastócito pode ser usado para designar a condição clínica de diarréia crônica intratável.

Hofman et al. (2007) estudaram a associação dos mastócitos na inflamação gástrica intestinal causada pelo *Helicobacter pylori*. Neste estudo, foram coletadas biópsias de 122 pacientes com gastrite crônica ativa infectados com *H. Pylori*, 84 pacientes com gastrite induzida por uso de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (DAINES) e de 48 voluntários saudáveis. A análise imunohistoquímica realizada com anticorpo anti-triptase, dentre outros marcadores de mastócitos, revelou que pacientes infectados com *H. pylori*, a densidade de mastócitos, e especialmente o número de células epiteliais associadas ao mastócito, correlacionou-se com um alto número de células epiteliais apoptóticas e com a presença de infiltrado neutrofílico

na mucosa gástrica. Os autores concluíram que a densidade de mastócitos pode ser considerada como um critério histopatológico de atividade de gastrite em pacientes infectados com *H. pylori*.

De Rossi et al. (2009) investigaram a detecção de triptase de mastócitos como um marcador para atividade inflamatória em pacientes com doença de Crohn. Foram detectadas triptase no soro de 48 pacientes com doença de Crohn ativa e em 31 pacientes com doença de Crohn inativa, sendo exames diagnósticos realizados por mais de seis meses através de ileocolonoscopia histológica, bem como sorologia e cultura das fezes. O grupo controle constando de cinquenta pacientes com idade média de 44 ± 15 anos que queixaram de desconforto intestinal inespecífico e alergias, infecções e outros transtornos intestinais sendo excluído por realização de diagnóstico clínico, sorologia de imunoglobulinas e cultura em fezes, dentre outros. A análise demonstrou níveis baixos da presença de triptase nos pacientes do grupo controle; no grupo de pacientes com Doença de Crohn ativo ou inativo os valores encontrados demonstrou estatisticamente não significante quando comparados ao grupo controle; já nos pacientes do grupo não tratados contendo mastocitose obtiveram valores aumentados da presença de triptase quando comparados aos demais grupos tendo níveis séricos muito aumentados. Os autores sugerem que a triptase pode ser usada no diagnóstico diferencial de pacientes com mastocitose.

Levick et al. (2009) desenvolveram um experimento modelo animal para estabelecer a relação de mastócito em processo inflamatório fibrótico ventricular em ratos hipertensos. Após análise imunohistoquímica os achados demonstraram índices aumentados de triptase de mastócito nos animais do grupo hipertrofia ventricular, sugerindo assim que o papel da triptase de mastócito está envolvida no processo fibrótico.

2.2 PAPEL DA TRIPTASE NA DOENÇA PERIODONTAL

Cox & Eley (1989) avaliaram o fluido crevicular coletado de pacientes com gengivite e periodontite e observaram que estas amostras apresentaram uma atividade proteolítica compatível com a de serino proteinases, mais especificamente com a triptase do mastócito. A inibição apenas parcial da atividade proteolítica dessas amostras de fluido crevicular, demonstrada após incubação prévia com inibidor de tripsina da soja (SBTI), sugeriu a participação de uma segunda enzima tipo tripsina de origem bacteriana ou do hospedeiro.

Eley & Cox (1990) avaliaram a atividade tipo triptase em tecidos gengivais homogeneizados de pacientes com periodontite crônica através do uso de substrato específico Z-Ala-Arg-Arg-AFC. Os autores encontraram uma alta atividade tipo triptase em tecido gengival de pacientes com periodontite crônica.

Eley & Cox (1992a) examinaram vinte pacientes com periodontite crônica não tratada, quanto à perda de inserção e quanto as medidas radiográficas de perda óssea. Em uma segunda visita, o fluido crevicular gengival foi coletado com tiras de papel filtro nos sítios dentais de maior profundidade de sondagem. Após a determinação do volume de fluido crevicular, a atividade proteolítica tipo triptase foi determinada com o uso de substrato específico Z-Ala-Ala-Lys-AFC. Os autores observaram que a atividade enzimática correlacionou-se positivamente com a perda de inserção clínica e com a perda óssea em uma análise de regressão linear.

Em estudo subsequente, Eley & Cox (1992b) examinaram vinte pacientes com periodontite crônica quanto aos seguintes parâmetros clínicos: profundidade de sondagem, perda de inserção clínica, índice gengival, índice de sangramento e índice de placa. A coleta de fluido crevicular foi realizada em segunda visita em sítios

dentais profundos. Os pacientes deste estudo receberam raspagem e aplainamento radicular e outros tratamentos não cirúrgicos apropriados. Os parâmetros clínicos foram analisados novamente e o fluido crevicular foi coletado dos mesmos sítios dentais que haviam sido utilizados na fase de pré-tratamento. A atividade proteolítica tipo triptase presente no fluido crevicular gengival foi determinada por um ensaio fluorimétrico. Os autores observaram que após o tratamento periodontal, houve redução de todos os parâmetros clínicos periodontais e na atividade proteolítica. Os autores sugerem que o nível de atividade proteolítica presente no fluido crevicular gengival pode refletir o status clínico das lesões periodontais e pode ser usado para monitorar a atividade de doença.

Kennett et al. (1993) determinaram histoquimicamente a presença de triptase do mastócito em biópsia de tecidos gengivais humanos. Os autores observaram que o maior número de triptase estava presente na lâmina própria, seguido pelo epitélio. Além disso, o número de células coradas foi maior no tecido gengival inflamado de pacientes com periodontite crônica em comparação com o tecido gengival saudável de pacientes controle. Os autores concluíram que a enzima triptase pode desempenhar um importante papel na patologia da periodontite crônica.

Walsh (2003) demonstrou que a degranulação de mastócitos é consistente com a presença de lesões inflamatórias orais (líquen plano, gengivite, pulpíte, inflamação periapical). Além disso, o autor demonstrou que a densidade de mastócitos nos compartimentos teciduais relaciona-se com o nível da expressão de E-seletina, uma molécula de adesão endotelial a qual pode ser induzida por ação de produtos da degranulação de mastócitos. Os autores concluem

que os produtos de mastócitos podem desempenhar um importante papel na inflamação da cavidade oral.

Gazi et al. (1996) estudaram as possíveis fontes das diferentes atividades proteolíticas encontradas no fluido crevicular gengival. Os autores coletaram amostras de tecido gengival e de fluido crevicular de pacientes com periodontite crônica. A cromatografia de filtração em gel das amostras teciduais demonstrou a presença de catepsina B e de triptase sensíveis aos inibidores de cisteína e serino proteinase, respectivamente. Foram preparadas amostras de células de periodontopatógenos de cepas de referência suspensas em meio de cultura. De todos os patógenos estudados, o *Porphyromonas gingivalis* foi o que demonstrou a maior atividade proteolítica compatível com a de cisteína proteases. Os padrões das bandas do fluido crevicular, tecido gengival e amostras bacterianas foram comparados em membranas impregnadas por substrato específico. Em membranas impregnadas com o substrato Z-Val-Lys-Arg-AFC, o fluido crevicular demonstrou bandas correspondentes as de catepsina B tecidual e à enzima do *P. gingivalis* e da *Treponema denticola*. O uso de membranas impregnadas com substrato D-Val-Leu-Arg-AFC demonstrou atividade no fluido crevicular semelhante à triptase tecidual. Os resultados deste estudo confirmaram a presença de catepsina B e triptase teciduais no fluido crevicular gengival.

Kennet et al. (1997) coletaram o fluido crevicular gengival de pacientes com periodontite crônica utilizando micropipetas e lamínulas contendo anticorpos para marcadores de leucócitos e Azul de Toluidina para identificar os mastócitos. Os autores observaram que o fluido crevicular de pacientes com periodontite crônica era composto de 70-80% granulócitos, 10-20% monócitos/macrófagos, 5% mastócitos e 5% de linfócitos T. A presença de proteases e de inibidores no fluido foi investigada

utilizando-se substratos específicos. A presença de elastase foi detectada em granulócitos, catepsina B em macrófagos, peptidases dipeptidil II e IV em linfócitos T, triptase em mastócitos e inibidor de proteinase alfa-1 e macroglobulina alfa-2 em alguns macrófagos. Os autores concluíram que as proteases de células inflamatórias parecem ser responsáveis pela maior parte da atividade enzimática mensurada no fluído crevicular gengival, e sugerem que esta associação possa explicar a possível correlação da atividade enzimática com progressão da doença periodontal.

Batista et al. (2005) identificaram e quantificaram a presença de mastócitos em diferentes estágios da doença periodontal humana utilizando técnicas de histoquímica (azul de toluidina) e imunohistoquímica (mastócitos positivos para triptase). Os autores observaram um aumento nas densidades de mastócitos em lesões de gengivite/ periodontite crônica comparadas à densidade de mastócitos em tecidos gengivais clinicamente saudáveis. Interessantemente, os mastócitos foram encontrados especialmente distribuídos em proximidade com células mononucleares. Os autores concluíram que existe um aumento do número de mastócitos na doença periodontal humana os quais podem participar dos eventos destrutivos da doença periodontal.

2.3 EFEITO DA INIBIÇÃO DA TRIPTASE, COM O NAFAMOSTASE MESILATE, SOBRE A DOENÇA INFLAMATÓRIA

Sendo et al. (2003a) avaliaram o efeito do pré-tratamento com nafamostase mesilate (MN) de 3 e 10mg/Kg, sobre a disfunção pulmonar induzida experimentalmente em ratos através da injeção intravenosa de ioxaglato (4g de iodine/Kg), um meio de contraste radiográfico. O nafamostase mesilate (10mg/Kg),

um importante inibidor de triptase, inibiu o extravazamento de proteínas e o edema pulmonar, além de inibir a atividade de triptase pulmonar purificada. Estes achados sugerem que a triptase liberada pelos mastócitos desempenha um papel crucial na disfunção pulmonar induzida pelo ioxaglato. Dessa forma, os autores sugerem que o nafamostase mesilate pode tornar-se um agente importante na cura e prevenção de reações adversas severas ao meio de contraste radiográfico.

Em um próximo estudo, Sendo et al. (2003b) observaram que o ioxaglato, material de contraste que degranula os mastócitos, provoca um aumento substancial da permeabilidade quando aplicado a células endoteliais da aorta bovina combinado aos mastócitos. Os autores observaram ainda que a nafamostate mesilate bloqueia esta ação do ioxaglato. Desta forma, os autores concluem que a triptase do mastócitos desregula a função da barreira endotelial através da ativação do receptor tipo 2 ativado por protease (PAR₂).

Mori et al. (2003) mostraram em um estudo farmacológico de cinética que o nafamostate mesilate inibe a triptase humana de maneira competitiva e que seu valor de k_i estimado é de 95.3pM. Estes autores apontam o fato de que esta droga é um inibidor extremamente potente da triptase e sugerem que alguns dos efeitos benéficos no tratamento do status clínico podem ser devidos à inibição da triptase.

Yoshii et al. (2005) ao examinarem trinta casos de adenocarcinoma de colon humano, encontraram um aumento no número de mastócitos. Devido ao fato de a triptase do mastócito ser considerada uma proteinase agonista do receptor tipo 2 ativado por protease (PAR₂), os autores investigaram os efeitos da estimulação do PAR₂ pela triptase sobre a sinalização celular e proliferação de DLD-1, uma linhagem celular de carcinoma de cólon humano. A estimulação do PAR₂ pela triptase levou à produção de prostaglandina E₂ e, a inibição da síntese de

prostaglandinas pela indometacina resultou em uma completa inibição das respostas proliferativas à triptase e ao peptídeo agonista do PAR₂. Além disso, os autores mostraram que a proliferação estimulada pela triptase sobre as células DLD-1 foi inibida de maneira concentração-dependente pela droga nafamostate mesilate. Os autores concluíram que a triptase exerce efeitos proliferativos sobre as células DLD-1 através da cicloxigenase e agindo sobre o PAR₂ através de sua atividade proteolítica.

Itoh et al. (2005) descreveram o papel da triptase e do receptor PAR-2 na resposta inflamatória aguda em pulmões utilizando modelo experimental em animais. Utilizaram de uma injeção intravenosa em ratos, de substância de contraste radiográfico a base de iodato, o qual induziu uma lesão pulmonar caracterizada por uma hipersensibilidade vascular, lesionando o endotélio, vindo a causar edema e depressão respiratória. O uso do nafamostate mesilate, potente inibidor de triptase, reduziu significativamente a lesão pulmonar nos modelos experimentais; sugerindo o envolvimento da triptase liberada pelos mastócitos no processo inflamatório.

Isozaki et al. (2006) investigaram os efeitos anti-inflamatórios do nafamostate mesilate sobre a colite experimental em ratos. Primeiramente os autores mostraram que a administração intracolônica de ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) dissolvido em álcool 50% levou à infiltração de inúmeras células positivas para a triptase na mucosa do cólon intestinal. Nafamostate mesilate, administrado intracolonicamente uma vez ao dia por seis dias após a administração de TNBS, diminuiu a injúria à mucosa do cólon intestinal e inibiu os aumentos na atividade de mieloperoxidase (MPO) e de fator de necrose tumoral (TNF)-alfa. Os autores concluíram que uma baixa dose de nafamostate mesilate (1mg/Kg) pode inibir a inflamação da mucosa do cólon induzida pelo TNBS, sugerindo que a terapia

anti-triptase com baixas doses de nafamostate mesilate tem um excelente potencial para torna-se uma nova estratégia terapêutica para a inflamação intestinal crônica.

Chen et al. (2006) investigaram os efeitos do nafamostate mesilate sobre a inflamação aérea em um modelo experimental de asma alérgica em camundongos. Neste estudo, camundongos BALB/c foram sensibilizados pelo *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p, 0,5mg/mL). A dose terapêutica de nafamostate mesilate (0.0625mg/Kg), administrada intraperitonealmente, reduziu a ativação de mastócitos, atenuou a infiltração de eosinófilos e diminuiu os níveis de IL-4 e de TNF- α induzido pelo Der p. Além disso, o tratamento com nafamostate mesilate diminuiu a expressão de IL-1 β , TNF- α , IL-6 e ativação de NF-KappaB, mas aumentou a expressão de IL-12 e IL-10 em macrófagos estimulados pelo Der p. Os autores concluíram que o nafamostate mesilate exerce efeitos terapêuticos sobre a inflamação aérea induzida por alérgeno, podendo constituir-se em um importante agente terapêutico no tratamento da asma.

Hagiwara et al. (2007) avaliaram o efeito do nafamostate mesilate sobre a injúria pulmonar induzida por lipopolissacarídeo (LPS). Quarenta e cinco ratos foram divididos em dois grupos de tratamento: (1) Grupo LPS (n=15): animais receberam injeção intraperitoneal com solução 0.9% NaCl trinta minutos antes da injeção intravenosa de LPS (5mg/Kg) na veia caudal; (2) Grupo NM + LPS (n=15): animais receberam injeção intraperitoneal de nafamostate mesilate (1mg/Kg) trinta minutos antes da injeção de LPS (5mg/Kg) na veia caudal; (3) Grupo controle (n=15): animais receberam uma injeção intraperitoneal de 0.9% NaCl trinta minutos antes da injeção intravenosa de 0.9% NaCl na veia caudal. Os animais foram sacrificados seis, 12 e 24 horas após a injeção intravenosa. A análise histológica demonstrou que o edema intersticial e o infiltrado leucocitário diminuíram acentuadamente no

grupo NM + LPS comparado ao grupo LPS. Além disso, o nafamostate mesilate diminuiu a concentração sanguínea de TNF-alfa em animais do grupo NM + LPS comparado aos animais do grupo LPS.

Ishizaki et al. (2008) investigaram em modelo animal o potencial terapêutico do nafamostate mesilate como inibidor de triptase em inflamações alérgicas de vias aéreas superiores. O uso do nafamostate mesilate reduziu significativamente o processo inflamatório nos tecidos das vias aéreas de animais com asma e também não observaram alterações nos pesos dos animais mesmo quando utilizando doses de até 300mg/kg.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo principal deste estudo foi avaliar o papel da triptase na progressão da doença periodontal induzida em ratos.

3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO 1:

Determinar o efeito da inibição da triptase sobre a perda óssea alveolar em ratos com periodontite experimental induzida por ligadura.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 2:

Determinar o efeito da inibição da triptase sobre a atividade de mieloperoxidase nos tecidos gengivais de dentes submetidos ou não à doença periodontal experimental.

4 MÉTODO

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No presente estudo foram avaliados os efeitos da inibição da triptase com a droga nafamostatate mesilate sobre a progressão da inflamação periodontal em ratos submetidos à periodontite experimental induzida pela colocação de ligadura. Mais especificamente, avaliou-se os efeitos da inibição da triptase sobre a atividade de mieloperoxidase tecidual e sobre a perda óssea alveolar aos sete e 14 dias de experimento.

4.2 ANIMAIS

Oitenta ratos Wistar machos (250-300g), provenientes do biotério central da Universidade Estadual Paulista- UNESP, Câmpus de Botucatu, foram acondicionados em ambiente com temperatura controlada e receberam água e comida *ad libitum*. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e separados de acordo com o grupo experimental. Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as normas aprovadas pelo Conselho de Cuidados e pelo Conselho de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté (Registro CEEA/UNITAU n. 0028/07) (Anexo A).

4.3 PROTOCOLO DE DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL

Após anestesia geral com administração intramuscular de Ketamina (0,08ml/100g peso corporal) e cloridrato de xilazina (0,04ml/100g de peso corporal), os primeiros molares inferiores do lado direito de cada animal, receberam a colocação de uma ligadura de fio de sutura 3.0 em uma posição submarginal a fim de induzir doença periodontal. Os animais controle (Sham) foram anestesiados e tratados da mesma maneira, mas sem a colocação de ligadura.

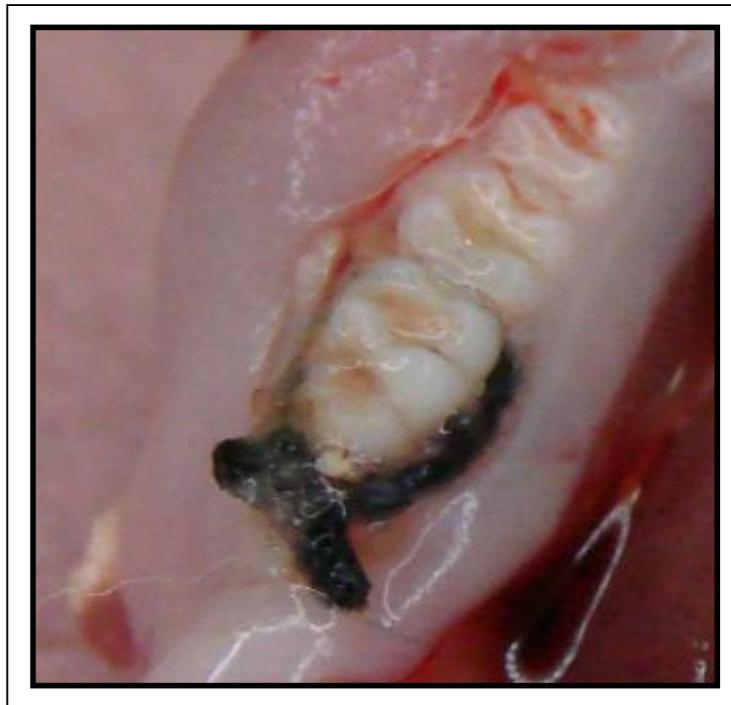


Figura 2 – Foto por vista oclusal mostrando ligadura em primeiro molar inferior, imediatamente após sacrifício aos sete dias do experimento

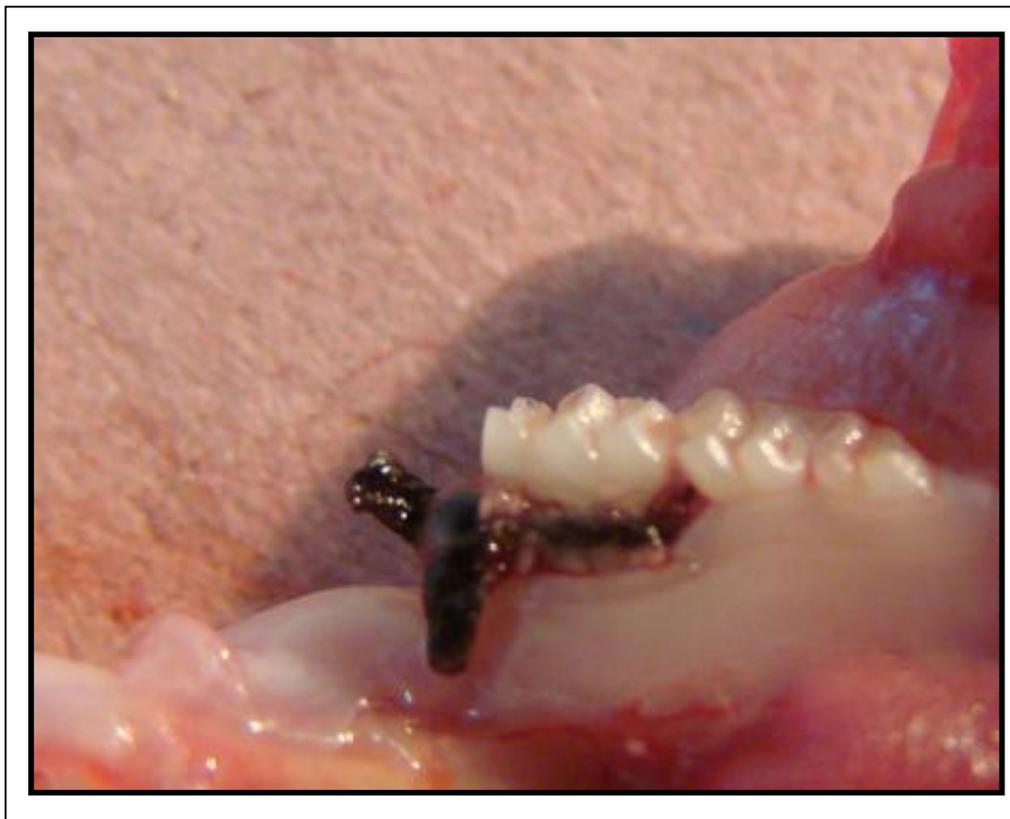


Figura 3 - Vista lingual mostrando ligadura em primeiro molar inferior, imediatamente após sacrifício aos 14 dias do experimento

4.4 ADMINISTRAÇÃO DE INIBIDOR ESPECÍFICO DE TRIPTASE

A droga nafamostatate mesilate (FUT-175, Biomol International, Plymouth Meeting, PA, United States) foi utilizada como um inibidor específico da triptase.

Os ratos foram aleatoriamente divididos em quatro grupos. O grupo Ligadura (n=20) foi submetido à colocação de ligadura e recebeu injeção intraperitoneal diária de solução salina (NaCl 0,9%) usada como veículo para a diluição da droga nafamostatate mesilate. O grupo NM + Ligadura (n=20) foi submetido à colocação de ligadura e recebeu injeção diária de nafamostatate mesilate (0,1mg/Kg de peso corporal). Os grupos Controle (n=20) e NM (n=20) não foram

submetidos à colocação de ligadura, e receberam injeção intraperitoneal diária de solução salina e nafamostatate mesilate, respectivamente. Dez animais por grupo foram sacrificados aos sete e 14 dias após a colocação de ligadura.

4.5 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE (MPO)

Uma porção com 1mm de espessura de tecido gengival ao redor dos primeiros molares inferiores do lado direito, submetidos ou não a colocação de ligadura, foi removida e utilizada para análise da atividade de mieloperoxidase (MPO), um marcador de infiltrado granulocítico. O tecido foi homogeneizado com o auxílio de um homogeneizador, desintegrador e emulsificador (tipo TURRAX da marca Marcone, modelo MA102, Piracicaba, São Paulo, Brasil) em brometo de hexadeciltrimetil amônia 10% em 50mmol/L de fosfato de potássio tamponado (pH 7.0). O homogenato foi então centrifugado por 15 minutos. Alíquotas do sobrenadante (35µL) foram adicionados a 3mL de tampão (100mmol/L de guaiacol, 0,17% H₂O₂, e 50mmol/L de fosfato de potássio tamponado, pH 7.0) A alteração na absorbância a 460nm foi mensurada com o auxílio de um espectrofotômetro Beckman (Beckman Instruments, Fullerton, CA). Uma unidade de atividade de MPO foi definida como 1µmol de peróxido degradado por minuto a 25°C.

4.6 MENSURAÇÃO DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR

As mandíbulas foram submetidas à limpeza manual e posterior imersão a solução de NaOH 2N à temperatura ambiente para completa remoção do tecido mole. A distância entre a junção cimento esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar

dos primeiros molares inferiores foi mensurada em aumento de 6.3x com o auxílio de um estereomicroscópio acoplada à uma câmera de vídeo e um software analisador de imagem (ImageJ, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA), o qual permitiu a mensuração digital da distância entre a JCE e a crista óssea alveolar. As medidas foram realizadas ao longo do eixo mediano da superfície lingual das raízes mesiais dos primeiros molares inferiores do lado direito; sendo predefinido em uma posição padrão ajustada pelo mesa e objetiva do estereomicroscópio para todas as mandíbulas no momento da captura da imagem. Estas mensurações foram realizadas por um examinador cego quanto aos grupos de tratamento.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância 1 fator (ANOVA) foi utilizada para comparar as médias de perda óssea alveolar e de atividade de MPO entre os diversos grupos. Nos casos em que existiu diferença significativa entre os grupos, realizaram-se comparações post-hoc entre pares por meio de teste estatístico Tukey-Kramer. Um valor de p menor do que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR

Verificaram-se resultados satisfatórios do modelo de periodontite experimental utilizado, observando-se uma maior perda óssea alveolar nos animais submetidos à colocação de ligadura (Figuras 4 e 5).

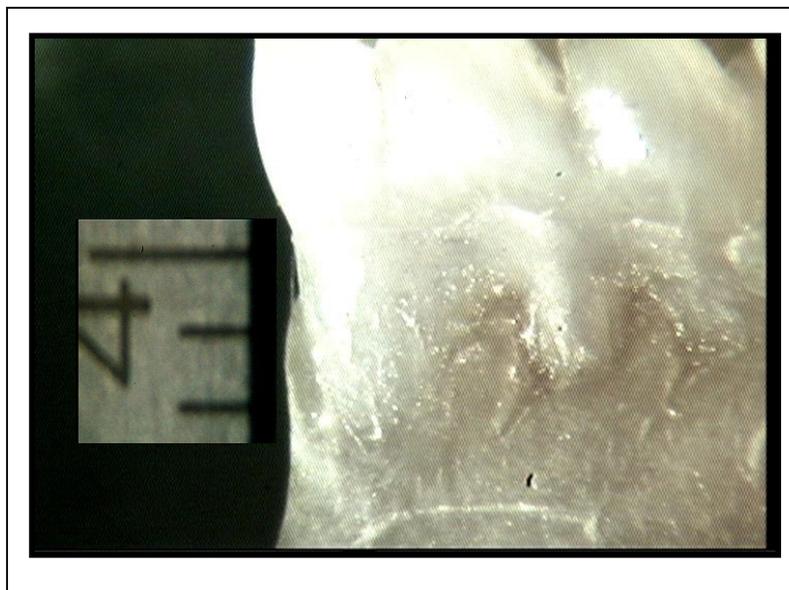


Figura 4 – Foto realizada com auxílio de um estereomicroscópio, aumento 10x mostrando primeiro molar inferior direito de animal pertencente ao grupo controle aos sete dias de experimento

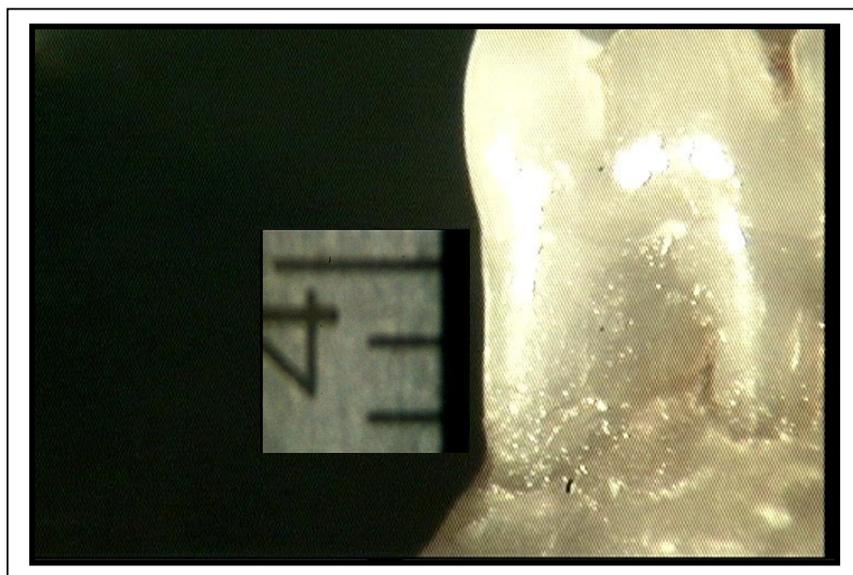


Figura 5 – Foto realizada com auxílio de um estereomi-croscópio, aumento 10x mostrando primeiro molar grupo ligadura aos sete dias, onde observa-se superfície mesial com perda óssea

Desta forma, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Ligadura aos sete (0.60 ± 0.22 e 1.20 ± 0.38 mm, $p < 0.001$) e aos 14 dias (0.60 ± 0.26 e 1.82 ± 0.26 mm, $p < 0.001$). Além disso, observou-se aumento progressivo da perda óssea alveolar após a colocação da ligadura, com aumentos significativos na perda óssea alveolar média entre os dias sete e 14 dias tanto para os grupos controle (1.20 ± 0.38 e 1.82 ± 0.26 mm, respectivamente sete e 14 dias, $p < 0.001$) quanto para os grupos NM (0.44 ± 0.16 e 0.97 ± 0.17 mm, respectivamente sete e 14 dias, $p < 0.01$).

O tratamento com o inibidor de triptase, nafamostatate mesilate (NM), levou à uma menor perda óssea alveolar nos animais submetidos à colocação de ligadura. Aos sete dias, a perda óssea média do grupo de animais tratados com NM e com periodontite experimental (NM+Ligadura: 0.44 ± 0.16 mm) não foi estatisticamente diferente daquela observada nos grupos controle (0.60 ± 0.22 mm) e NM

($0.42 \pm 0.16 \text{mm}$) e foi estatisticamente menor em relação ao grupo Ligadura ($1.20 \pm 0.38 \text{mm}$, $p < 0.001$).

Já aos 14 dias, após a colocação de ligadura, observou-se uma perda óssea significativa no grupo NM+Ligadura ($0.97 \pm 0.17 \text{mm}$) quando comparada a perda óssea verificada nos grupos Controle ($0.60 \pm 0.26 \text{mm}$, $p < 0.001$) e NM ($0.39 \pm 0.23 \text{mm}$, $p < 0.001$). No entanto, esta perda óssea alveolar foi estatisticamente menor em relação ao grupo Ligadura ($1.82 \pm 0.26 \text{mm}$, $p < 0.001$).

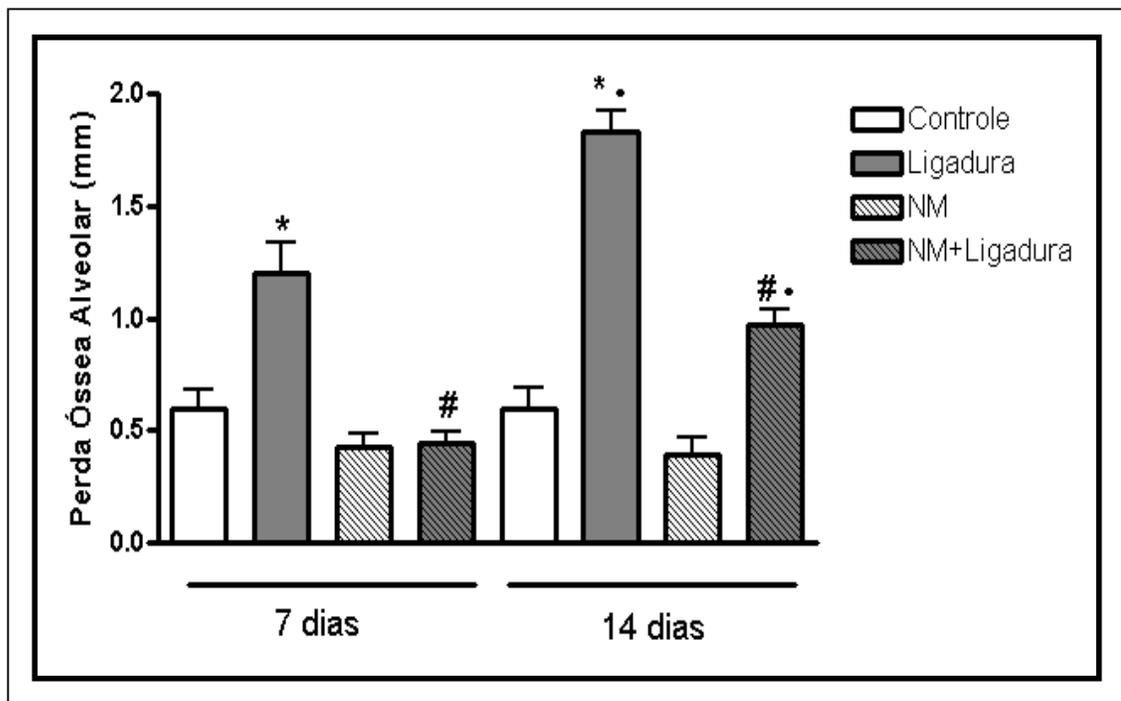


Figura 6 – Perda óssea alveolar média nos diferentes grupos de tratamento, sendo que (*) significa que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle; (#) significa que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação grupo com ligadura no mesmo período (sete ou 14 dias) e (•) significa que há diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao período de sete dias em mesmo grupo de tratamento experimental

5.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE

A avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO) nos tecidos gengivais examinados demonstrou resultados estatisticamente ($p < 0.05$) aumentados para os grupos experimentais submetidos à colocação de ligadura aos sete e 14 dias de experimento. Assim, houve diferença estatisticamente significativa com relação à atividade de MPO média entre os grupos Controle e Ligadura aos sete ($p < 0.001$) e aos 14 dias ($p < 0.001$).

O tratamento com o inibidor de triptase, nafamostatate mesilate, levou à uma menor atividade de MPO nos animais submetidos à colocação de ligadura somente aos 14 dias do tratamento, quando comparado ao grupo Ligadura no mesmo período experimental.

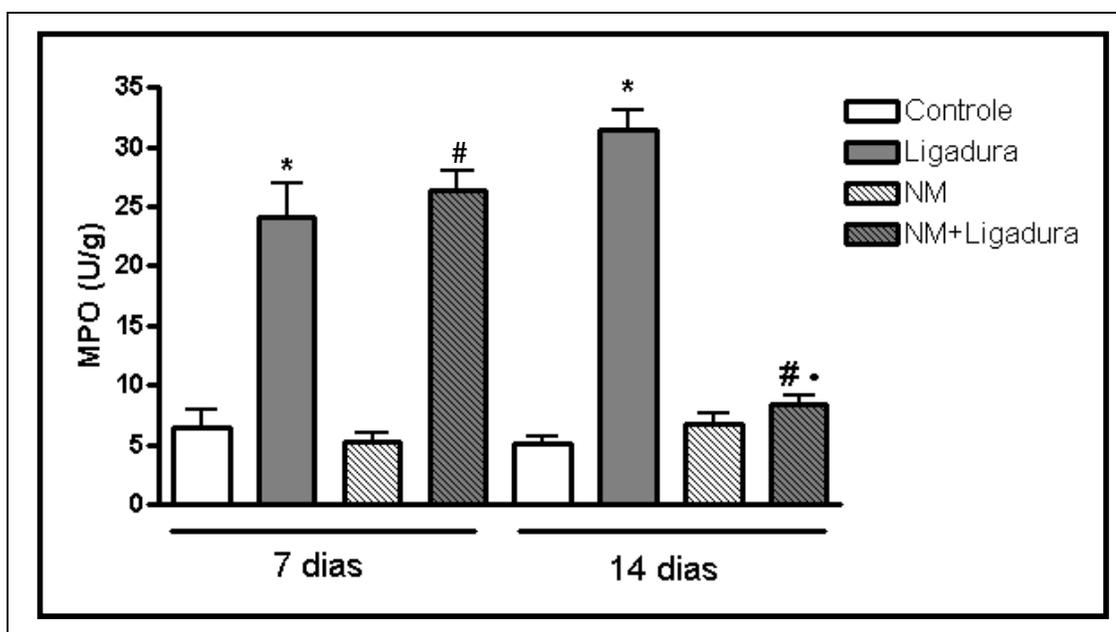


Figura 7 – Atividade MPO média, sendo que (*) significa que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle; (#) significa que há diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação grupo com ligadura no mesmo período (sete ou 14 dias) e (*) significa que há diferença estatística ($p < 0.05$) em relação ao período de sete dias em mesmo grupo experimental

6 DISCUSSÃO

Tradicionalmente, os mastócitos têm sido considerados como células efetoras na reação alérgica. No entanto, na última década, tem-se observado que os mesmos também estão envolvidos nos mecanismos da imunidade inata e adquirida (Harvima et al., 2008). Através da ativação por mecanismos de degranulação, os mastócitos podem secretar inúmeros mediadores solúveis, os quais podem interagir com outras células, como células endoteliais, queratinócitos, nervos sensoriais, neutrófilos, células T e células apresentadoras de antígeno, os quais são efetores essenciais no desenvolvimento da inflamação (Walsh, 2003).

A triptase é um mediador pré-formado nos grânulos dos mastócitos, cuja atividade funcional mais importante é facilitar o recrutamento de granulócitos pela indução da secreção epitelial de interleucina-8 (Caughey, 1994; Welle, 1997), a qual atua na vasodilatação, extravazamento de plasma e infiltração de células inflamatórias (Corteling et al., 2003). O presente trabalho mostrou que aos 14 dias de experimento, a inibição da triptase do mastócito, com a administração diária de nafamostatate mesilate (NM), levou à uma redução significativa da atividade de mieloperoxidase (MPO), um marcador da infiltração tecidual de granulócitos, no tecido gengival de ratos com doença periodontal induzida por ligadura. Pelo fato de os neutrófilos polimorfonucleares representarem a principal fonte de MPO, e por mediar a injúria tecidual e a liberação de inúmeros mediadores inflamatórios, podemos sugerir que a triptase desempenha um importante papel na inflamação periodontal.

A associação dos mastócitos com a reabsorção óssea tem sido estudada por quase cinquenta anos. Um número elevado de mastócitos tem sido relacionado com uma perda óssea acelerada, ou seja, com uma inibição de osteoblastos e com

um aumento da expressão e atividade osteoclástica (Teronen et al., 1996; Qiu et al., 2005). Observou-se no presente estudo que a inibição da triptase do mastócito levou à uma redução significativa da destruição periodontal em ratos com doença periodontal induzida por ligadura. A inibição de triptase preveniu o início da reabsorção óssea aos sete dias de experimento, sendo que neste período não observou-se diferenças significativas quanto ao nível ósseo alveolar médio do grupo de animais com ligadura tratados com NM daquele observado nos grupos controle. Ainda, aos 14 dias após a colocação de ligadura, embora tenha ocorrido uma alteração significativa no nível ósseo alveolar em relação ao período anterior, observou-se que a inibição de triptase levou a uma redução estatisticamente significativa da perda óssea alveolar em relação ao grupo de animais não tratados. Desta forma, os achados do presente estudo evidenciam o importante papel da triptase como mediador na progressão da destruição óssea periodontal e talvez expliquem a possível associação dos mastócitos com o metabolismo ósseo.

Os mecanismos pelos quais a triptase exerce seus efeitos na degradação tecidual não são totalmente conhecidos, embora algumas recentes evidências científicas tenham sugerido que a triptase pode levar à degradação do tecido conjuntivo pela ativação direta de pró-colagenases e por ser capaz de iniciar uma cascata de metaloproteinases da matriz (Walsh, 2003). Além disso, acredita-se que algumas das ações fisiológicas da triptase possam ser mediadas pela ativação do receptor tipo-2 ativado por protease ou PAR₂ (Nystedt et al., 1994; Böhm et al., 1996). A triptase, assim como a tripsina e fatores de coagulação (VIIa / Xa), tem a capacidade de clivar o domínio N-terminal do PAR₂ gerando uma nova sequência ligante N-terminal a qual liga-se ao próprio receptor, ativando-o e resultando em respostas pró-inflamatórias (Holzhausen et al., 2005a), tais como relaxamento dos

vasos sanguíneos, hipotensão, aumento da permeabilidade vascular, adesão e marginação leucocitária, infiltração granulocítica e dor (Cocks & Moffatt, 2000; Vergnolle et al., 2001; Coughlin & Camerer, 2003). Além disso, há evidências substanciais de que o PAR₂ possa regular a atividade de células alvo no periodonto (Lourbakos et al., 1998; Abraham et al., 2000; Lourbakos et al., 2001; Uehara et al., 2003; Holzhausen et al., 2005b; Holzhausen et al., 2006).

Embora de natureza infecciosa, a patogênese da doença periodontal é semelhante a várias outras doenças inflamatórias quanto às suas vias de progressão. A presença de bactérias específicas em um biofilme estimula respostas imunes responsáveis pela destruição dos tecidos periodontais. A tentativa de manipulação da resposta imune denomina-se de modulação da resposta do hospedeiro e visa modificar a resposta do hospedeiro alterando o curso do processo inflamatório, suprimindo reações indesejáveis, tais como, a degradação dos tecidos conjuntivo e ósseo. Tentativas de eliminação dos agentes infecciosos nem sempre representam uma terapia definitiva na doença periodontal. Existem, por exemplo, alguns fatores de risco não microbianos que são difíceis de serem reduzidos ou eliminados (fumo, diabetes) ou que encontram-se além da habilidade do clínico para serem controlados (predisposição genética). Nestes casos, e em grupos de indivíduos mais susceptíveis à doença periodontal, a combinação de terapias modulatórias do hospedeiro e tratamentos antibacterianos pode ser vantajosa.

Dessa forma, futuros estudos serão necessários para o desenvolvimento de terapias modulatórias inovadoras no combate à progressão da perda óssea alveolar e no melhor entendimento da relação entre a triptase e a doença periodontal.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que a enzima triptase participa ativamente do processo destrutivo inflamatório nos tecidos periodontais de ratos submetidos à colocação de ligadura. Desta forma, acredita-se que estudos futuros possam avaliar o papel da modulação farmacológica da triptase, através de terapias anti-proteolíticas, como uma importante abordagem terapêutica da doença periodontal inflamatória humana

REFERÊNCIAS

1. Schenkein HA. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontology* 2000 2006; 40:77-93.
2. Schwartz EM, Krimperfort P, Berns A, Verma IM. Immunological defects in mice with a targeted disruption in Bcl-3. *Genes Dev* 1997; 11(2):187-197.
3. Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanism of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontology* 2000 1997;14:144-157.
4. Emberry G, Waddington R. Gingival crevicular fluid: biomarkers of periodontal tissue activity. *Adv Dental Res* 1994; 8(2):329-36.
5. Loos BG, Tjoa S. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? *Periodontol* 2000 2005; 39:53-72.
6. Steinsvoll S, Helgeland K, Schenck K. Mast cells -a roll in periodontal disease? *J Clin Periodontol* 2004; 31(6):413-419.
7. Lin TJ, Befus AD. Mast cells and eosinophils in mucosal defenses and pathogenesis. *Mucosal Immunology* 1999; 469-482.
8. Steinsvoll S, Halstensen TS, Schenck K. Extensive expression of TGF- β 1 in chronically-inflamed periodontal tissue. *J Clin Periodontol* 1999; 26(6):366-373.
9. Gunhan M, Bostanci H, Gunhan O, Demiriz M. Mast cells in periodontal disease. *Ann Dent* 1991; 50(1):25-29.
10. Kennett CN, Cox SW, Eley BM, Osman IA. Comparative histochemical and biochemical studies of mast cell tryptase in human gingiva. *J Periodontol* 1993; 64(9):870-877.
11. Cox SW, Eley BM. Tryptase-like activity in crevicular fluid from gingivitis and periodontitis patients. *Journal of Periodontal Research* 1989; 24(1):41-44.
12. Eley BM, Cox SW. A biochemical study of serine proteinase activities at local gingival tissue sites in human chronic periodontitis. *Archives of Oral Biology* 1990; 35(1): 23-27.
13. Eley BM, Cox SW. Cathepsin B/L-, elastase-, tryptase-, trypsin- and dipeptidyl peptidase IV-like activities in gingival crevicular fluid: correlation with clinical parameters in untreated chronic periodontitis patients. *Journal of Periodontal Research* 1992a; 27(1): 62-69.

14. Eley BM, Cox SW. Correlation of gingival crevicular fluid proteases with clinical and radiological measurements of periodontal attachment loss. *Journal of Dent* 1992b; 20(2): 90-99.
15. Nakano S, Mishiro T, Takahara S, Yokoi H, Hamada D, Yukata K, et al. Distinct expression of mast cell tryptase and protease activated receptor-2 in synovia of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 2007; 26(8):1284-1292.
16. Yoshida N, Isozaki Y, Takagi T, Takenaka S, Uchikawa R, Arizono N, et al. Review article: anti-tryptase therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol* 2006; Suppl 4:249-255.
17. He S, Walls AF. Human mast cell tryptase: a stimulus of microvascular leakage and mast cell activation. *Eur J Pharmacol* 1997; 328(1):89-97.
18. He S, Peng Q, Walls AF. Potent induction of a neutrophil and eosinophil-rich infiltrate in vivo by human mast cell tryptase: selective enhancement of eosinophil recruitment by histamine. *J Immunol* 1997; 159(12):6216-6225.
19. Frungiery MB, Weidinger S, Meineke V, Kohn FM, Mayerhofer A. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR², COX², prostaglandins, and PPAR_γ: possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(23):15072-15077.
20. Lohi J, Harvina I, Keski-Oja J. Pericellular substrates of human mast cell tryptase: 72000 dalton gelatinase and fibronectin. *J Cell Biochem* 1992; 50(4):337-349.
21. Isozaki Y, Yoshida N, Kuroda M, Handa O, Takagi T, Kokura S, et al. Anti-tryptase treatment using nafamostat mesilate has a therapeutic effect on experimental colitis. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41(8):944-953.
22. Bischoff SC, Wedemeyer J, Herrmann A, Meier PN, Trautwein C, Cetin Y, et al. Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. *Histopathology* 1996; 28(1):1-13.
23. Sepper R, Kontinen YT, Kempainen P, Sorsa T, Eklund KK. Mast cells in bronchiectasis. *Ann Med* 1998; 30(3):307-315.
24. Matsunaga Y, Terada T. Mast cell subpopulations in chronic inflammatory hepatobiliary diseases. *Liver* 2000; 20(2):152-156.
25. Xiong S, Puri P, Nemeth L, O'Brian DS, Reen DJ. Neuronal hypertrophy in acute appendicitis. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124(10):1429-1433.
26. Roberts IS, Brenchley PE. Mast cells: the forgotten cells of renal fibrosis. *J Clin Pathol* 2000; 53(11):858-862.
27. Esposito I, Friess H, Kappeler A, Shrikhande S, Kleeff J, Ramesh H, et al. Mast cell distribution and activation in chronic pancreatitis. *Hum Pathol* 2001; 32(11):1174-1183.

28. Nishida Y, Murase K, Isomoto H, Furusu H, Mizuta Y, Riddell RH, et al. Different distribution of mast cells and macrophages in colonic mucosa of patients with collagenous colitis and inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 2002; 49(45):678-682.
29. Stoyanova II, Gulubova MV. Mast cells and inflammatory mediators in chronic ulcerative colitis. *Acta Histochem* 2002; 104(2):185-192.
30. Solari V, Unemoto K, Piaseczna Piotrowska A, Puri P. Increased expression of mast cells in reflux nephropathy. *Pediatr Nephrol* 2004; 19(2):157-163.
31. Kinoshita M, Okada M, Hara M, Furukawa Y, Matsumori A. Mast cell tryptase in mast cell granules enhances MCP-1 and interleukin-8 production in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(9):1858-1863.
32. Iosub R, Klug J, Fijak M, Schneider E, Fröhlich S, Blumbach K, et al. Development of testicular inflammation in the rat involves activation of proteinase-activated receptor-2. *J Pathol* 2006; 208(5):686-698.
33. Jakate S, Path FRC, Demeo M, Rohan J, Tobin M, Keshavarzian A. Mastocytic Enterocolitis: Increased Mucosal Mast Cells in Chronic Intractable Diarrhea. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130:362-367.
34. Hofman V, Lassalle S, Selva E, Kalem K, Steff A, Hébuterne X, et al. Involvement of mast cells in gastritis caused by *Helicobacter pylori*: a potential role in epithelial cell apoptosis. *J Clin Pathol* 2007; 60(6):600-700.
35. De Rossi TM, Krauss N, Wilken V, Giera B, Konturek PC, Kressel J, et al. Mast cell tryptase in sera of patients with Crohn's disease and mastocytosis. *Euro Jour Gastr & Hepatol* 2009; 21(3):273-277.
36. Levick SP, McLarty JL, Murray DB, Freeman RM, Carver WE, Brower GL. Cardiac Mast Cells Mediate Left Ventricular Fibrosis in the Hypertensive Rat Heart. *Hypertension* 2009; 6:1041-1047.
37. Walsh L. Mast cells and oral inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14(3):188-198.
38. Gazi MI, Cox SW, Clark DT, Eley BM. A comparison of cysteine and serine proteinases in human gingival crevicular fluid with tissue, saliva and bacterial enzymes by analytical isoelectric focusing. *Arch Oral Biol* 1996; 41(5):393-400.
39. Kennett CN, Cox SW, Eley BM. Investigations into the cellular contribution to host tissue proteases and inhibitors in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 1997; 24(6):424-431.
40. Batista AC, Rodini CO, Lara VS. Quantification of mast cells in different stages of human periodontal disease. *Oral Diseases* 2005; 11(4):249-254.

41. Sendo T, Itoh Y, Goromaru T, Sumimura T, Saito M, Aki K, et al. Potent tryptase inhibitor nafamostat mesilate dramatically suppressed pulmonary dysfunction induced in rats by a radiographic contrast medium. *Br J Pharmacol* 2003a; 138(5):959-967.
42. Sendo T, Sumimura T, Itoh Y, Goromaru T, Aiki K, Yano T, et al. Involvement of proteinase-activated receptor-2 in mast cell tryptase-induced barrier dysfunction in bovine aortic endothelial cells. *Cell Signal* 2003b; 15(8):773-781.
43. Mori S, Itoh I, Shinohata R, Sendo T, Oishi R, Nishibori M. Nafamostat mesilate is an extremely potent inhibitor of human tryptase. *J Pharmacol Sci* 2003; 92:420-423.
44. Yoshii M, Jikuhara A, Mori S, Iwagaki H, Takahashi HK, Nishibori M, et al. Mast cell tryptase stimulates DLD-1 carcinoma through prostaglandin- and MAP kinase-dependent manners. *J Pharmacol Sci* 2005; 98(4):450-458.
45. Itoh Y, Sendo T, Oishi R. Physiology and Pathophysiology of Proteinase-Activated Receptors (PARs): Role of Tryptase/PAR-2 in Vascular Endothelial Barrier Function. *J Pharmacol Sci* 2005; 97:14-19.
46. Chen CL, Wang S, Zeng Z, Lin K, Kao S, Tami T, et al. Serine protease inhibitors nafamostat mesilate attenuate allergen-induced airway inflammation and eosinophilia in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118(1):105-112.
47. Hagiwara S, Iwasaka H, Nogushi T. Nafamostat mesilate inhibits the expression of HMGB1 in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *J Anesth* 2007; 21:164-170.
48. Ishizaki M, Tanaka H, Kajiwara D, Toyohara T, Wakahara K, Inagaki N, et al. Nafamostat mesilate, a potent serine protease inhibitor, inhibits airway eosinophilic inflammation and airway epithelial remodeling in a murine model of allergic asthma. *J Pharmacol Sci* 2008; 108:355-363.
49. Harvima IT, Nilsson G, Suttle MM, Naukkarinen A. Is there a role for mast cells in psoriasis? *Arch Dermatol Res* 2008; 300:461-478.
50. Caughey GH. Serine proteinases of mast cell and leukocyte granules. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:S138-S142.
51. Welle M. Development, significance and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukocyte Biol* 1997; 61:233-245.
52. Corteling R, Bonneau O, Ferretti S, Ferretti M, Trifilieff A. Differential DNA synthesis in response to activation of protease-activated receptors on cultured guinea-pig tracheal smooth muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2003; 368(1):10-16.

53. Teronen O, Hietanen J, Lindqvist C, Salo T, Sorsa T, Eklund KK, et al. Mast cell-derived tryptase in odontogenic cysts. *J Oral Pathol Med* 1996; 25(7):376-381.
54. Qiu J, Beckman MJ, Qian J, Jiranek W. Simultaneous labeling of mast cell proteases and protease mRNAs at the bone-implant interface of aseptically loosened hip implants. *J Orthop Res* 2005; 23(4):942-948.
55. Nystedt S, Emilsson K, Wahlestredt C, Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:9208-9212.
56. Böhm SK, Kong W, Bromme D. Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J* 1996; 314:1009-1016.
57. Holzhausen M, Spolidorio LC, Vergnolle N. Role of protease-activated receptor-2 in inflammation, and its possible implications as a putative mediator of periodontitis. *Men Inst Oswaldo Cruz* 2005a; 100:177-180.
58. Cocks TM, Moffatt JD. Proteinase-activated receptors: sentries for inflammation? *TIPS* 2000; 21:103-108.
59. Vergnolle N, Bunnet NW, Sharkey KA, Brussee V, Compton S, Grady E, et al. Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: novel pain pathway. *Nat Med* 2001; 7:821-826.
60. Coughlin SR, Camerer E. Participation in inflammation. *J Clin Invest* 2003; 111:25-27.
61. Lourbakos A, Chinni C, Thompson P, Potemba J, Travis J, Mackie EJ, et al. Cleavage and activation of proteinase-activated receptor-2 on human neutrophils by gingipain-R from *Phophyromonas gingivalis*. *FEBS Lett* 1998; 435(1):45-48.
62. Abraham LA, Chinni C, Jenkins AL. Expression of proteinase-activated receptor-2 by osteoblast. *Bone* 2000; 26:7-14.
63. Lourbakos A, Potemba J, Travis J. Arginine-specific proteinase from *Phophyromonas gingivalis* activates proteinase-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect Immun* 2001; 69:5121-5130.
64. Uehara A, Muramoto K, Takada H, Sugawara S. Neutrophil serine proteinases activate human nonepithelial cells to produce inflammatory cytokines through proteinase-activated receptor-2. *J Immunol* 2003; 170:5690-5696.
65. Holzhausen M, Spolidorio LC, Vergnolle N. Proteinase-activated receptor-2 agonist causes periodontitis in rats. *J Dent Res* 2005b; 84:154-159.
66. Holzhausen M, Spolidorio LC, Ellen RP, Jobin MC, Steinhoff M, Andrade-Gordon P, et al. Protease-Activated receptor-2 activation: a major role in the pathogenesis of *Porphyromonas gingivalis* infection. *Am J Pathol* 2006; 168:1189-1199.

ANEXO

ANEXO A - Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa



Instituto Básico de Biociências
Avenida Tiradentes, n° 500 – centro
Cep: 12030-180 - Taubaté/SP
Tel/Fax: 3629-7909 - tel: 3629-2319
ibb@unitau.br e institutobio@unitau.br

DECLARAÇÃO

Dec. n° 028/07

Registro CEEA/UNITAU n° 0028/07 (esse n° de registro deverá ser citado pelo pesquisador nas correspondências referentes a este projeto).

Projeto de Pesquisa: Efeito da inibição de triptase sobre o desenvolvimento de doença periodontal induzida em ratos-

Pesquisador Responsável: Marinella Holzhausen

O Comitê de Ética para Experimentação Animal, em reunião de 19/07/2007 e no uso das competências definidas na Deliberação CONSEP N° 362/2003, considerou o Projeto acima **aprovado**.

Taubaté, 30 de agosto 2007.

Profª Drª Naira Correa Cusma Pelogia
Coordenador do Comitê de Ética para Experimentação Animal
Universidade de Taubaté

Cópia

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desta obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Rodrigo Dalla Pria Balejo

Taubaté – SP, Novembro de 2009.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)