



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Rafaela Rangel Serra

**MICROSCOPIA INTRAVITAL: PADRONIZAÇÃO DA APLICAÇÃO
TÓPICA NO MODELO DA BOLSA DA BOCHECHA DO HAMSTER**

**Rio de Janeiro
2015**



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

RAFAELA RANGEL SERRA

Microscopia Intravital: Padronização da aplicação tópica no modelo da bolsa da
bochecha do hamster

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Formação Técnica para Pesquisa
Biomédica, Instituto de Biofísica Carlos
Chagas Filho, da Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do
título de Mestre.

Orientadores: Prof. Robson Coutinho-Silva
Prof. Erik Svensjö
Co-orientadores: Prof. Julio Scharfstein

Rio de Janeiro
2015

Serra, Rafaela Rangel

Microscopia Intravital: Padronização da aplicação tópica no modelo da bolsa da bochecha do hamster

UFRJ/IBCCF,2015.

Tese (mestrado profissional) – UFRJ/ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / Programa de Pós-graduação em Formação Técnica para a Pesquisa Biomédica, 2015.

1. Microscopia intravital. 2. Microcirculação. 3. *Porphyromonas gingivalis*

I. Silva, Robson Coutinho. II. Svensjö, Erik. III. Julio. Scharfstein, Julio. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me apoiaram e as minhas amadas avós Neusa e Tereza que fizeram parte desse crescimento.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me abençoar a cada amanhecer me dando forças para vencer meus temores.

Aos meus amados pais Ricardo Serra e Neusa Serra, pelo exemplo de vida, amor, superação e principalmente pelas orações nos momentos de adversidades. Amo para sempre!

A minha querida irmã e melhor amiga Ana Carolina Serra pelos momentos de apoio e desabafos, sempre acreditando no meu potencial.

Ao meu amado marido Anderson Teles pela conquista diária, amor, carinho, respeito e pelos momentos de apoio e sinceridade.

Ao orientador Robson Coutinho-Silva por ter acreditado em mim e por ter me aceitado como aluna associada ao seu laboratório. Recordando a nossa primeira conversa inspiradora que me fez aceitar este desafio.

Ao meu Co-orientador Julio Scharfstein que nunca deixou de acreditar na minha capacidade em realizar esse mestrado. Agradeço também pelos momentos de debates e argumentações que me fizeram crescer e amadurecer profissionalmente e cientificamente.

Ao professor Erik Svensjö, que através de suas habilidades e profundos conhecimentos pude aprender tudo que sei sobre a técnica aplicada neste trabalho, além disso, seu carinho e sua paciência sempre me motivaram a encarar meus desafios.

.

.

Aos amigos do laboratório de Imunologia Molecular: Alda, Bruno, Carla, Clarissa, Daniela, Erivan, Julia, Juliana, Larissa, Leila, Lucas e a Professora Ana Carolina e aos mais novos integrantes Eric e Rafael.

As minhas queridas amigas Daniele Andrade, Leila Faustino, Leticia Maneiras e Gabriela Sevilha pelo companheirismo, fidelidade e carinho que sempre tiveram comigo. Amigas que na hora da angústia se tornam irmãs.

Aos meus amigos do mestrado profissional técnico, em especial Jorgete, Joana, Leile e Felipe, que são pessoas maravilhosas, dedicadas, sempre dando apoio e escutando meus desabafos. Com vocês aprendi muitas coisas boas, estudei bastante e ri muito também, principalmente nos momentos de desespero em que faziam piada do meu cabelo literalmente em pé! rs

A todos os Professores deste Instituto e do Programa do Mestrado Profissional Técnico que de alguma forma colaboraram direta ou indiretamente realizar este trabalho.

Resumo

A microscopia de fluorescência intravital é utilizada para estudar diversos aspectos da estrutura e função microcirculatória. Com o objetivo de avaliar os mecanismos envolvidos na integração da microcirculação com o sistema imune e padronizar novas possibilidades de análises para medir a intensidade de fluorescência nas vênulas pós-capilares, nós utilizamos o modelo experimental da bolsa da bochecha do hamster como uma ferramenta para estudar a permeabilidade vascular induzida pela *Phorphyromonas gingivalis*. Como uma alternativa às abordagens já existentes de medidas de imagens, nós padronizamos uma nova forma de aplicação (tópica) que não apresentou diferenças significativas se comparadas com a forma de aplicação em perfusão já previamente estabelecida. A *Phorphyromonas gingivalis* é capaz de induzir o aumento de permeabilidade vascular e dilatação dos vasos. Além disso, o ATP é capaz de induzir a degranulação de mastócitos liberando mediadores inflamatórios, e ainda age como sinal de perigo assim como a bradicinina (via gingipaína). Como as fímbrias são fatores de virulência que induzem respostas inflamatórias, nós investigamos o papel da fímbria no aumento da permeabilidade e a função dos mastócitos neste processo. Utilizamos as cepas de *Phorphyromonas gingivalis*, 381 (selvagem) e a cepa DPG3 (nocaute para fímbria) e observamos que as bactérias nocautes apresentaram menor capacidade inflamatória, quando comparadas com as selvagens. O tratamento com o cromoglicato e a aplicação tópica do composto 48/80 inibiu e induziu a degranulação dos mastócitos, respectivamente, demonstrando a contribuição dos mastócitos na geração ou liberação de sinais de perigo no contexto da permeabilidade vascular induzida pela *Phorphyromonas gingivalis*.

Abstract

Intravital fluorescence microscopy is used to examine different aspects of the structure and microcirculatory function. In order to evaluate the mechanisms involved in the integration of the microcirculation with the immune system and standardize new possibilities for analysis to measure the fluorescence intensity in the post-capillary venules, we used the experimental model of the hamster cheek pouch as a tool to study vascular permeability induced by *Phorphyromonas gingivalis*. As an alternative to the existing measures of images approaches, we standardized a new form of application (topical) that showed no significant differences compared with the application form in perfusion previously established. *Phorphyromonas gingivalis* is able to induce an increase in vascular permeability and vessel dilation. Besides, ATP is able to induce degranulation of mast cells releasing inflammatory mediators and also acts as a danger signal like bradykinin (via gingipain). As fimbriae are virulence factors which induce inflammatory responses, we investigated the role of fimbriae in an increase in permeability and function of mast cells in this process. We used strains of *Phorphyromonas gingivalis*, 381 (wild type) and the strain DPG3 (fimbriae knockout) and we observed that bacteria knockouts had lower inflammatory capacity compared to wild type strain. Treatment with cromolyn and topical application of 48/80 compound inhibited and induced mast cell degranulation respectively demonstrating the contribution of mast cells in the generation or release of danger signals in the context of vascular permeability induced by *Phorphyromonas gingivalis*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Microcirculação.....	1
1.2. Permeabilidade vascular em vênulas pós-capilares.....	3
1.3. Microscopia Intravital.....	4
1.4. Modelo de Microcirculação: Bolsa da Bochecha do Hamster.....	5
1.5. Aplicabilidade da Técnica de Microscopia Intravital.....	7
2. JUSTIFICATIVA	9
3. OBJETIVOS.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1. Microscopia Intravital.....	11
4.2. Cultura da <i>P.gingivalis</i>	15
4.3. Análises Estatísticas.....	15
5. RESULTADOS	16
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÃO.....	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

B₂R – Receptor de bradicinina do tipo 2

BBH - Bolsa da bochecha do hamster

BHI – Brain Heart Infusion (Infusão de coração e cérebro)

BK- Bradicinina

C5a – fator do sistema complemento

CO₂ – Dióxido de Carbono

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

LPS – Lipopolissacarídeo

N₂ – Nitrogênio

O₂ - Oxigênio

P2 – Receptor purinérgico do tipo 2

PBS – Solução tamponada com fosfatos

pH- Potencial hidrogeniônico

RFU – Unidade relativa de fluorescencia

TLR₂ – Receptor do tipo toll 2

TNF α – Tumoral Necrosis Factor- α (Fator de Necrose Tumoral- α)

VPCs – Vênulas pós-capilares

1. Introdução

1.1 Microcirculação

A microcirculação é conceituada como a circulação do sangue através dos menores vasos do corpo presentes em órgãos e tecidos. Isto contrasta com a macrocirculação, que é a circulação do sangue a partir dos órgãos. A microcirculação é organizada em três seções principais, arteríolas, capilares e vênulas; cada uma com estrutura e função única. As arteríolas são vasos oriundos das artérias de pequeno calibre que avançam em direção ao sistema capilar através de ramificações progressivas. Em suas paredes vasculares, encontram-se células musculares lisas, possuindo 10-100 μm de diâmetro. Desprovidos de músculo liso, os capilares possuem cerca de 5-8 μm de diâmetro interno revestidos por uma única camada de células endoteliais e membrana basal fina. Já as vênulas possuem pouco músculo liso e apresentam 10-200 μm de diâmetro. Além destes vasos, a microcirculação inclui também capilares linfáticos, capazes de repor à circulação pequenas quantidades de proteínas ou líquidos que vazam para os espaços intersticiais.

É importante ressaltar que as principais funções da microcirculação são o fornecimento de oxigênio e nutrientes, e a remoção de CO_2 . A microcirculação também regula o fluxo sanguíneo e a perfusão tecidual, influenciando a pressão arterial e o processo inflamatório, recuperando a homeostase tissular após formação de edema/inchaço (Levick, 2010). Essas estruturas formadoras do leito microvascular também podem ser divididas em três segmentos, de acordo com suas funções específicas em: vasos de resistência - arteríolas, metarteríolas também chamadas por alguns fisiologistas como arteríolas terminais e os esfíncteres pré-capilares que controlam o fluxo sanguíneo aos órgãos; vasos de troca - capilares; vasos de capacitância - vênulas que são reservatórios de volume (Berne *et al.*, 2004).

A figura 1 mostra a estrutura de um leito capilar idealizado por Boron e Boulpaep (Boron e Boulpaep, 2008) (Figura 1). Sob condições fisiológicas, o sangue proveniente das artérias flui para as arteríolas (ramificações finais do sistema arterial), de onde passa para os capilares. Dali segue para as vênulas (segmentos iniciais do sistema venoso), que por sua vez desembocam nas veias de retorno, até ao coração (Martins e Silva, 2012).

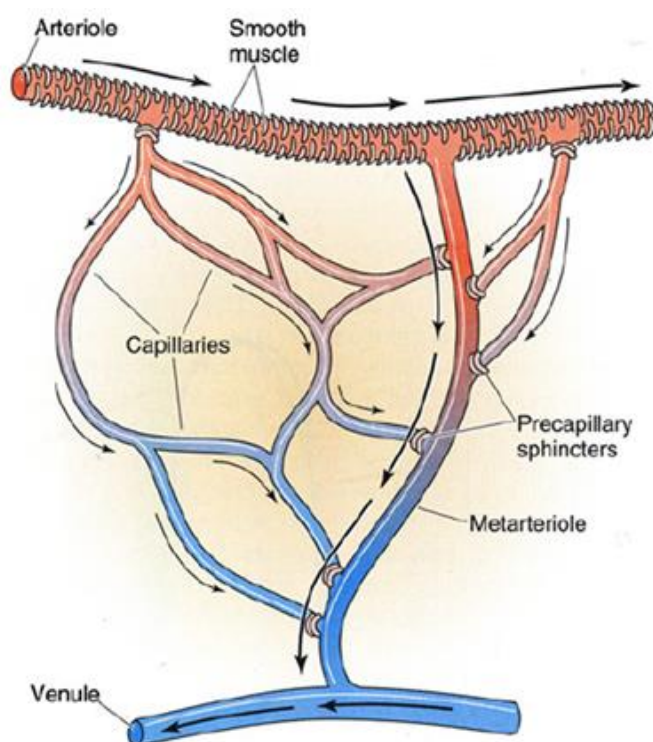


Figura 1. Circuito microcirculatório proposto por Boron e Boulpaep, 2008.

As células endoteliais e as células musculares lisas representam os principais elementos funcionais da parede dos vasos sanguíneos permitindo que arteríolas, capilares e vênulas realizem suas funções. Estas células desempenham um papel central no sistema de controle do funcionamento da microcirculação por regular a trombose e fibrinólise microvascular, a adesão e migração leucocitária, o tônus arteriolar, a permeabilidade e o recrutamento capilar, todos determinantes do fluxo sanguíneo capilar e, por conseguinte, da oferta de oxigênio aos tecidos (Trzeciak, 2008 e Aird, 2004). A ativação de células endoteliais em cada segmento vascular por produtos bacterianos e / ou mediadores liberados localmente permite uma resposta deliberada e coordenada da microcirculação ao insulto inflamatório.

Outros componentes da parede vascular, incluindo o músculo liso vascular e pericitos, bem como células que residem normalmente na região perivascular, tais como os macrófagos e os mastócitos, contribuem para a resposta inflamatória e servem para induzir e/ou amplificar os eventos associados com a ativação de células endoteliais. A amplificação e perpetuação da resposta inflamatória ocorrem mediante recrutamento e ativação de leucócitos e plaquetas. Estas células do sistema imune inato trazem seu próprio arsenal de mediadores para o sítio inflamatório (Ley, 2008; Kubes e Granger, 1996). É importante ressaltar que a arquitetura da microcirculação varia entre os órgãos, mas os elementos fundamentais da microcirculação são comuns a todos os leitos vasculares (Wiedman, 1984).

1.2 Permeabilidade vascular em Vênulas Pós – Capilares

As vênulas pós-capilares (VPCs) (8 – 30 μm de diâmetro), componentes fundamentais da microvasculatura, sofrem alterações agudas da permeabilidade vascular em tecidos expostos a diversos mediadores inflamatórios, tais como bradicinina e histamina (Svensjö e Arfors, 1979). As VPCs representam o segmento da microvasculatura que é mais reativa à mediadores inflamatórios. Isso se deve ao fato que as VPCs contêm junções intercelulares endoteliais que podem abrir permitindo que as proteínas do plasma e células circulantes (leucócitos) escapem da corrente sanguínea. As vênulas representam o principal local de troca transvascular

proteicas (permeabilidade vascular às proteínas plasmáticas) e tráfico de leucócitos (células de adesão leucócito-endotélio). É importante destacar que o músculo liso aparece na média de vênulas maiores (vênulas musculares) que drenam as vênulas pós-capilares. A natureza passiva muscular distensível das vênulas pós-capilares é responsável pela capacidade destes microvasos em armazenar e mobilizar quantidades significativas de sangue em certos órgãos (Sakai *et al.*, 2000; Dodd e Johnson, 1991; Majno, 1965; House e Johnson, 1986).

Os estímulos inflamatórios, tais como a histamina, a trombina, o fator de crescimento vascular endotelial, neutrófilos ativados e estímulos pró-inflamatórios, como TNF- α , induz a ruptura das junções de células endoteliais, assim como induz a desorganização do citoesqueleto (Kumar, 2009; Stagg, 2013 e Sawant, 2013) levando assim a permeabilidade paracelular (Michel, 2004 e Tharakan, 2012). Algumas técnicas de imagens permitem a visualização do efluxo de macromoléculas fornecendo assim informações importantes sobre a função da barreira endotelial e sobre a natureza temporal e espacial das alterações de permeabilidade vascular em reações inflamatórias. Uma das metodologias mais empregadas para analisar estes processos é microscopia intravital.

1.3. Microscopia Intravital

A microscopia intravital produz imagens que nos permitem estudar a microdinâmica de processos biológicos em animais vivos. Os avanços técnicos combinados com o desenvolvimento de novas sondas e modelos de experimentação permitiram abordar diversas questões nas áreas da biologia como a oncologia, biologia celular, imunologia e neurociência (Vinegoni, 2014).

A microscopia intravital de fluorescência baseia-se na excitação de um fluoróforo em um comprimento de onda, resultando na emissão de luz de um comprimento de onda diferente. A filtragem de luz, em seguida, permite o microscópico uma visão direta ou uma observação através de um intensificador de imagem (Kenne e Lindbom, 2011). Esta técnica foi utilizada em uma variedade de modelos, incluindo a asa de morcego, bolsa da bochecha do hamster (BBH), orelha de coelho, mesentério de roedores e o tecido cremaster (Granger e Schmid-Schonbein, 1995).

Estudos revelam que a permeabilidade dos microvasos tem sido avaliada a partir de observações do extravasamento de corantes intravasculares como azul patente V (Olson *et al.*,1975), azul de evans, protamina azul céu (Mc Master e Parsons,1939), azul de tripan e fluoresceína sódica (Hauck e Schröer, 1969). O uso da microscopia intravital para estudos de reações inflamatórias permitiu a quantificação de eventos microvasculares através do uso intravascular de uma fluoresceína combinada com dextran (FITC-dextran), um marcador de alto peso molecular. Quando empregados nas doses recomendadas, os efeitos na função plaquetária e formação de coágulos são mínimos (Olson *et al.*,1975, Svensjö, 2006; Svensjö *et al.*, 1978).

O FITC-dextran possui propriedades estáveis e semelhantes ao dextran tradicional e por este motivo tem sido amplamente empregado em observações diretas por microscopia de fluorescência, em tecidos transparentes. O FITC-dextran tem se mostrado um traçador adequado para estudos da permeabilidade vascular (Rutili e Arfors, 1976).

1.4. Modelo de Microcirculação: Bolsa da Bochecha do Hamster

A bolsa da bochecha dos hamsters (BBH) é um tecido que contém invaginações bilaterais da mucosa oral, as quais se estendem desde o tecido subcutâneo até a região do ombro (figura 2).

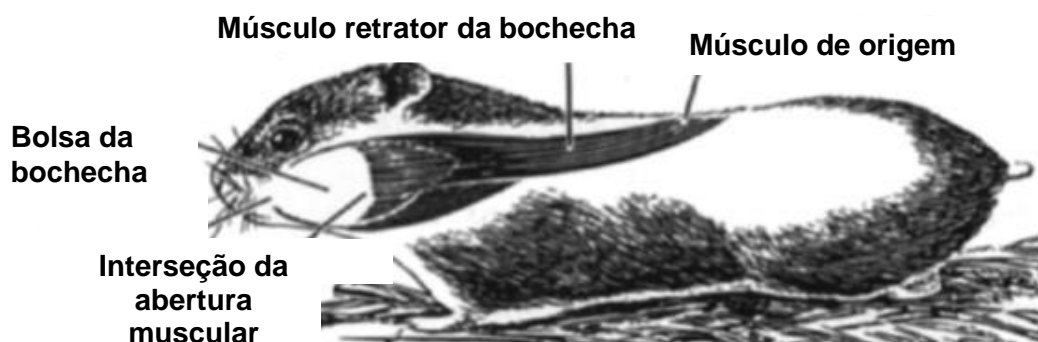


Figura 2: *Mesocricetus auratus*, Hamster dourado Sírio. Hochman, 2004.

O comprimento da bolsa quando estendida é aproximadamente de 2,5 a 5,5 cm, e a largura é em torno de 1 cm. É importante ressaltar que esse tecido não possui nenhuma região específica de linfonodos. Devido à ausência de drenagem linfática na região não muscular da BBH, este tecido é caracterizado como uma região imunologicamente privilegiada. O epitélio é desprovido de folículos capilares e glândulas. A bolsa está ligada ao tecido subcutâneo por tecido conjuntivo frouxo e os vasos da bolsa são irrigados principalmente pelos ramos da artéria carótida externos através de três artérias saculares. Estas bolsas são apropriadas para serem utilizadas na microscopia intravital, já que quando evertidas o seu fluxo sanguíneo se mantém intacto. Além disso, o tecido desta bolsa é transparente e os elementos anatômicos da microcirculação, arteríolas, capilares e vênulas podem ser facilmente identificados (Figura 3) (Priddy e Brodie, 1948; Handler e Shepro, 1968; Svensjö, 2006).

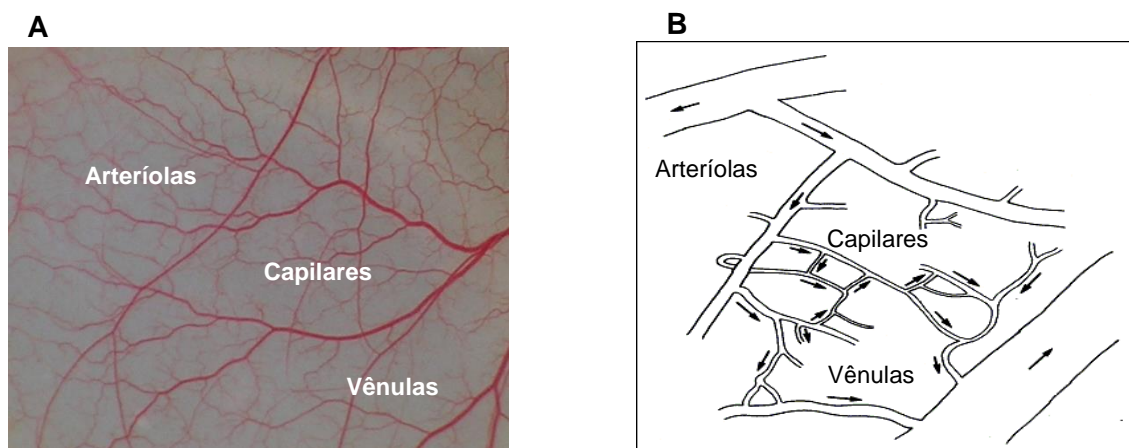


Figura 3. Padrão da microcirculação da bolsa da bochecha do hamster com as respectivas estruturas vasculares identificadas. (A) Imagem do tecido realizada pelo microscópio intravital (fase campo claro). (B) esquema adaptado de Wiedeman em 1963.

1.5- Aplicabilidades da Técnica de Microscopia Intravital

A BBH tem sido usada em estudos de inflamação como na indução por diferentes mediadores inflamatórios como a bradicinina, histamina, adenosina, adenosina difosfato (ADP), serotonina, prostaglandina, leucotrienos, por uma isquemia temporária (IR) ou pela aplicação de parasitas protozoários como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* (Svensjö e Roempke, 1985, Svensjö, 1990 e 2006) e a bactéria *Porphyromonas gingivalis* (Monteiro *et al.*, 2009).

Dentre as diversas infecções e modelos de inflamação, a *P. gingivalis* destaca-se pelo fato de ser comumente associada com doença periodontal (Socransky *et al.*, 1998). O processo infeccioso que gera a doença inicia-se com a formação do biofilme dental, que gera uma resposta inflamatória, podendo resultar na perda dos ligamentos periodontais, perda óssea e eventual perda da unidade dental (Schenkein, 2006).

A *P. gingivalis* é um cocobacilo anaeróbico, gram negativo, imóvel (Shah *et al.*, 1988; Gibson *et al.*, 2006). Pelo fato de causar doença periodontal crônica (Zambon, 1999), a *P. gingivalis* tem sido intensamente investigada do ponto de vista molecular sendo sua patogenicidade atribuída a um conjunto de potentes fatores de virulência, tais como as cisteína proteases (gingipainas), hemaglutininas, lipopolissacarídeos (LPS), fímbrias (Yoshimura *et al.*, 2008). Estas moléculas facilitam a colonização inicial, assim como a retenção e o crescimento da *P. gingivalis* dentro do sulco gengival (Lamont, 2000; Hajishengallis, 2009). Estudos publicados revelam também que o LPS e a gingipaina da *P. gingivalis*, respectivamente, agindo como ligante de receptores do tipo Toll 2 (TLR2) e como protease liberadora de cinina, ativam o eixo inato TLR2/B₂R (B₂R- receptores B₂ de bradicinina), amplificando a inflamação ao mesmo tempo em que geram sinais de perigo endógeno, que por sua vez, guiam o desenvolvimento de células T efetoras (Th1/Th17) específicas contra o antígeno fímbria (Monteiro *et al.*, 2009).

Nesta dissertação, iremos estudar o efeito microcirculatório do ATP (adenosina trifosfato), um sinal clássico, liberado de células danificadas ou estressadas. Além de estimular respostas imuno-específicas (Elliott *et al.*, 2009), o ATP é um sinal de perigo liberado de células necróticas e apoptóticas. Agindo como um sinal quimiotático, o ATP atrai os monócitos para o tecido lesionado, onde os

fagócitos internalizam células mortas. Uma vez liberados no espaço extracelular, o ATP pode ativar diretamente duas famílias de receptores ligados à membrana chamados purinoreceptores P2 (P2Y e P2X) (Burnstock, 2007) sendo o ATP o único agonista natural dos receptores purinérgicos P2X (North, 2002).

O ATP também foi identificado entre os fatores que induzem a degranulação de mastócitos (Dahlquist e Diamant, 1974; Sugiyama, 1971). Sabe-se que após sua ativação, os mastócitos liberam grânulos contendo numerosos mediadores, tais como, fator de necrose tumoral (TNF), histamina, heparina, serotonina, cinina, proteases, ATP entre outros (Galli e Tsai, 2008; Rao e Brown, 2008). Além do ATP, uma variedade de outros agonistas podem ativar os mastócitos. Estes incluem fatores do sistema complemento (C5a), mediadores lipídicos (prostaglandinas, leucotrienos), neuropeptídeos (substância P), hormônios (somatostatina), citocinas, quimiocinas, produtos microbianos (LPS ou peptidoglicano), bem como nucleotídeos extracelulares (Stelekati, 2007; Di Virgilio *et al.*, 2001).

Os mastócitos são conhecidos como os principais componentes das reações inflamatórias alérgicas, mas também estão envolvidos na patogênese de uma série de doenças inflamatórias crônicas, na cicatrização de feridas, na fibrose (Galli e Tsai, 2008; Rao e Brown, 2008). Há evidências crescentes de que os mastócitos são células reguladoras-chaves capazes de coordenar e integrar vários ramos do sistema imune inato posicionando-se estrategicamente nas proximidades dos vasos sanguíneos, nos epitélios, nas células musculares lisas e nervos onde podem executar sua função como uma primeira linha de defesa contra alérgenos ou agentes patogênicos (Galli e Tsai, 2008). Estudos demonstram também que os mastócitos da BBH estão preferencialmente localizados ao longo das arteríolas em relação às vênulas (Raud, 1989), com isso o uso da técnica de microscopia intravital irá nos permitir estudar essa contribuição dos mastócitos e do ATP no modelo de infecção por *P.gingivalis*.

2. Justificativa

Utilizando o modelo experimental da bolsa da bochecha do hamster (BBH) evertida, o objetivo inicial deste trabalho foi empregar a técnica de microscopia intravital estabelecida no laboratório de Imunologia Molecular como uma ferramenta para analisar alterações da permeabilidade vascular induzida pela aplicação tópica da bactéria *P. gingivalis* na BBH. Esta metodologia nos permitiu investigar os mediadores e vias de ativação envolvidas na resposta inflamatória desencadeada por este periodontopatógeno, tendo como referência o efeito induzido pela histamina. Além disso, estudamos o papel de mastócitos na resposta microvascular provocada pela referida bactéria. Durante a implementação desta metodologia, tivemos a oportunidade de utilizar novos critérios de medição da intensidade de fluorescência emitida nas vênulas pós-capilares. Para atingir este conjunto de metas, foi necessário (i) realizar a preparação cirúrgica dos hamsters de acordo com as normas do comitê de ética para o uso de animais - IBCCF 101 (ii) aprender a explorar plenamente os recursos da microscopia (epi-fluorescência) intravital clássica (iii) manipular os programas de aferição de intensidade de fluorescência (iv) analisar criticamente os dados, empregando os métodos estatísticos adequados.

3. Objetivo Geral

Padronizar a aplicação tópica para o modelo da bolsa da bochecha do hamster empregando a técnica de microscopia intravital.

3.1- Objetivos Experimentais Específicos

- Aperfeiçoar a técnica de aplicação tópica de patógenos e respectivos controles (tampões).
- Validar o uso da técnica de microscopia intravital em modelos de infecção envolvendo aplicação tópica de patógenos.
- Empregar novos critérios de aferição da intensidade média de fluorescência emitida através das vênulas pós-capilares.
- Avaliar se a técnica pode ser utilizada para investigar o papel de mastócitos na resposta induzida pela *P. gingivalis*.

4. Material e Métodos

4.1- Microscopia Intravital

A preparação da BBH para estudos fisiológicos da microcirculação foi desenvolvida e refinada por Duling em 1973 utilizando a bolsa da bochecha evertida (Duling, 1973) e modificada para o uso de FITC-dextran (Svensjö *et al.*, 1978). Hamsters machos (*Mesocricetus auratus*, 90-120g) foram anestesiados com 0,1- 0,2 mL de pentobarbital sódico 3 % ou uma combinação de ketamina (200mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg) intraperitoneal, suplementado com doses endovenosas de α -cloralose. Todos os cuidados com os animais e os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética da UFRJ (número de código: IBCCF 101).

A temperatura corporal do animal foi mantida por meio de uma manta aquecedora, controlada por um termistor retal e para facilitar a respiração espontânea foi realizada uma traqueostomia. A veia femoral direita foi canulada para injeções de FITC-dextran e de α -cloralose (Figura 4).

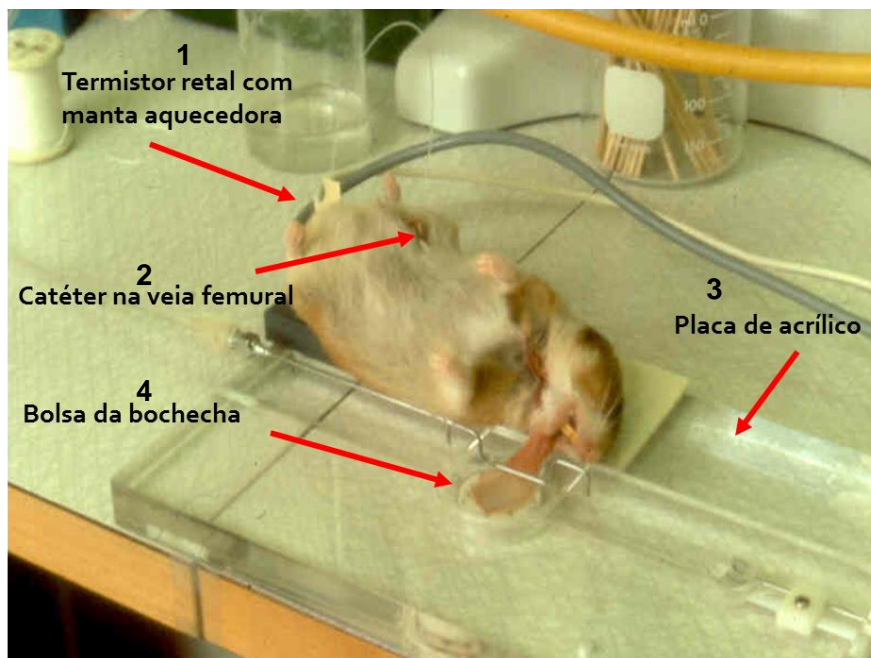


Figura 4: Etapas da preparação cirúrgica para a técnica de microscopia intravital. Após o animal devidamente anestesiado com pentobarbital ou ketamina e xilazin i.p, sua temperatura foi controlada por uma manta aquecedora através de um termistor (1), o animal foi submetido a canulação na veia femoral direita (2) em seguida acomodado na placa adaptadora de acrílico (3) e a bolsa da bochecha devidamente retirada e fixada na região apropriada para ser superfundida (4).

A BBH foi evertida com auxílio de um cotonete e fixada com ganchos tênues na placa de acrílico apropriada para acomodar o tecido, em seguida abre-se o tecido de forma a minimizar a manipulação evitando causar danos aos vasos maiores na fixação das laterais do tecido (figura 5).

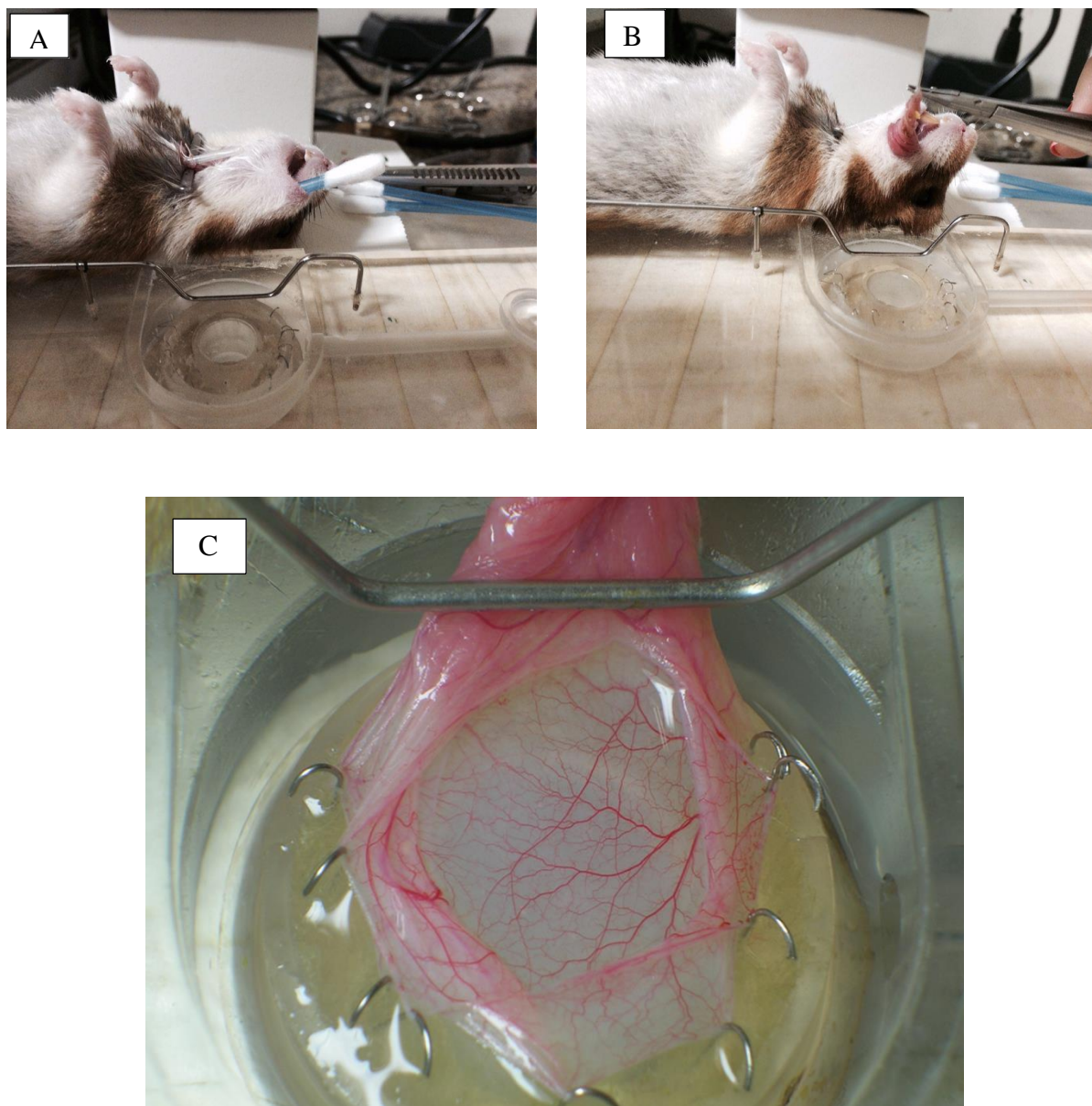


Figura 5: Imagens ilustrativas da retirada da bolsa. Com auxílio de um cotonete a bolsa é evertida, limpa e fixada com pinos na região apropriada para acomodar o tecido e conseqüentemente superfundida pelo tampão (A e B). Em seguida manipula-se de forma cuidadosa para esticar e fixar as laterais do tecido sem causar danos aos vasos maiores (C).

A BBH foi continuamente superfundida com uma solução tipo Ringer (Ca^{2+} , K^+ e Na^+), ou seja, uma solução isotônica a fim de manter as condições normais do sangue, ela foi aquecida (35°C), tamponada com bicarbonato e HEPES para manter o pH em 7,4 e borbulhada com uma mistura de N_2 e CO_2 (95:5%), para manter uma pressão parcial de O_2 ao nível fisiológico. A velocidade de perfusão da solução foi de 5 mL/min que é suficiente para manter o nível de oxigênio menor que 10 mm Hg (Figura 6A). Para a aplicação tópica, uma pipeta volumétrica de 1000 mL juntamente com a ponteira foi utilizada para a aplicação de 500 μl do tampão ou da bactéria sobre o tecido já preparado cirurgicamente (Figura 6B). A observação da microcirculação na bochecha do hamster foi feita usando o microscópio Axioskop 40, com objetiva de 4x, ocular de 10x (Carl Zeiss, Germany) e equipada com filtros apropriados para a observação da fluorescência (490/520 nm, FITC-dextran). Uma câmera digital, AxioCamHRc e um computador equipado com o programa Axio Vision 4.4 Software (Carl Zeiss, Germany) foram usados para obter e analisar as imagens (Svensjö, 2006).

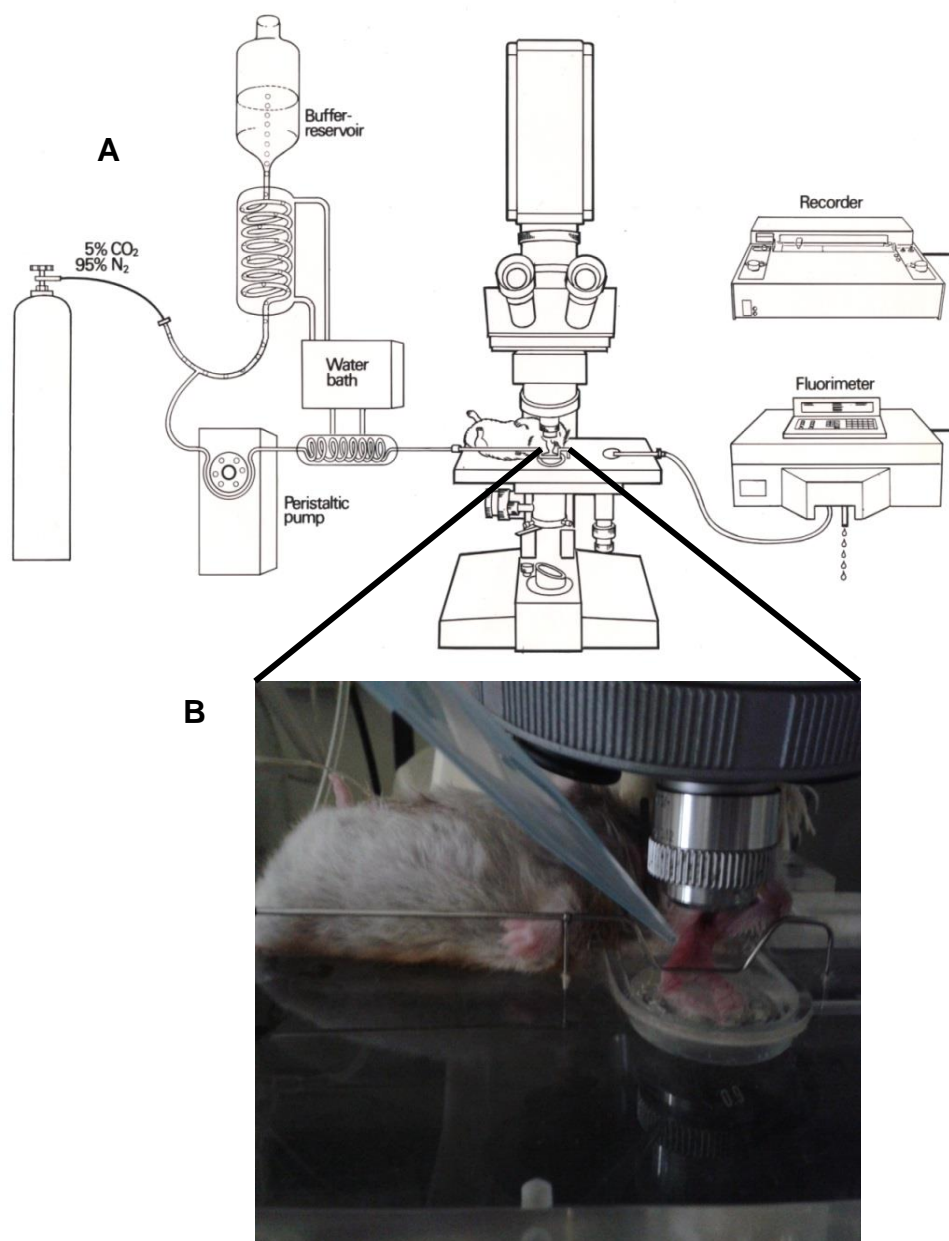


Figura 6. Esquema do modelo experimental da bolsa da bochecha do hamster (BBH). (A) A solução de perfusão da bochecha do hamster é aquecida e equilibrada com 5% de CO₂ e 95% de N₂. A velocidade de perfusão da solução foi de 5mL/min controlada por uma bomba peristáltica e a observação da microcirculação na bochecha do hamster foi feita usando o microscópio Axioskop 40, com objetiva de 4x e ocular de 10x (Carl Zeiss, Germany). (B) Imagem da aplicação tópica na BBH.

Os diâmetros e a fluorescência total das bochechas dos hamsters foram capturados em uma área selecionada representativa (5 mm^2) onde medimos a média de intensidade de fluorescência durante todo o experimento (figura 7). A fluorescência capturada 30 min após a injeção de FITC-dextran, em cada experimento, foi ajustada para 2000 unidades de fluorescência por questões estatísticas e os diâmetros das arteríolas neste mesmo tempo foram definidos como $\mu\text{m} \times 100$ para manter a mesma escala de RFU (Relative Fluorescent Units – Unidade Relativa de Fluorescência).

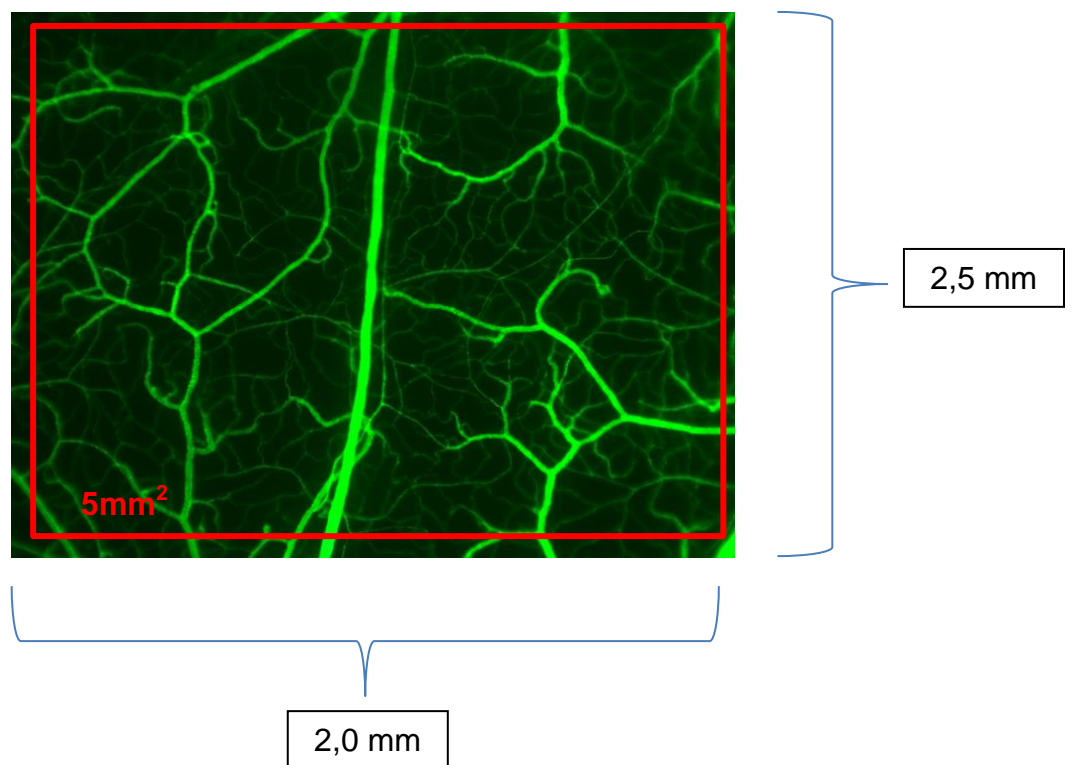


Figura 7: Efeitos do marcador FITC e a seleção da área de estudo. Com auxílio de uma câmera digital, AxioCam HRc, um computador equipado com o Software Axio Vision 4.4 e um microscópio equipado com filtros apropriados para a observação da fluorescência (490/520 nm, FITC-dextran), identificamos o leito vascular marcado e selecionamos a área total 5 mm^2 a ser estudada. O programa permite a captura das imagens e a análise da média de intensidade de fluorescência de acordo com o tempo necessário para a experimentação.

4.2- Cultura de *Porphyromonas gingivalis*

As bactérias *P. gingivalis* foram cultivadas em meio Agar-BHI (brain heart infusion), suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, 0,2% de extrato de levedura, 0,5 mg/mL de menadiona e 1 mg/mL hemina. Incubadas por sete dias em jarra de anaerobiose usando o sistema GasPack (BD- Bioscience) para manter a atmosfera de 85% N₂, 5% CO₂, 10% H₂ a 37°C. Após esse período, as colônias bacterianas foram transferidas para tubos contendo caldo BHI - brain heart infusion, suplementado com 0,2% extrato de levedura, 0,5 mg/mL de menadiona e 1 mg/mL hemina (foi adicionado 10 µg/mL de eritromicina para a cepa isogênica deficiente em fímbria DPG3) e incubadas em anaerobiose como descrito acima por 48h a 37°C. Para a quantificação desejada de UFC/mL de *Porphyromonas gingivalis* foi feita a padronização a partir da densidade ótica do caldo por meio de espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 600 nm estabelecendo a densidade de 0,5 equivalente a 10⁹ bactérias/mL. Para os ensaios de permeabilidade vascular, as diferentes cepas da *Porphyromonas gingivalis* 381 e DPG3 foram lavadas e ressuspensas em PBS de acordo com as concentrações desejadas.

4.3 – Análises Estatísticas

A avaliação estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido pelo teste t-Student (entre os grupos) para o gráfico 11, sendo considerado o valor $P \leq 0,05$ como indicador de uma diferença estatisticamente significativa. Para os de mais, não houve diferença entre as médias devido ao baixo número de experimentos.

5. Resultados

5.1- Padronização da histamina como controle positivo interno na microcirculação

A utilização da histamina como um agente vasoativo foi realizada como controle interno da técnica para obter uma resposta positiva da microcirculação, já que esse mediador inflamatório é capaz de provocar vasodilatação com consequente aumento da permeabilidade e recrutamento de leucócitos, além de provocar a contração das células endoteliais. (Raud e Lindbom, 1994; Thorlacius *et al.*, 1995; Majno e Palade, 1961). Os hamsters então foram submetidos à técnica de acordo com a metodologia. Após a realização da microcirurgia, aplicou-se o marcador fluorescente FITC-dextran 150 kDa intravenoso, e as medidas foram adquiridas durante 30 minutos para verificar se o fluxo capilar e a microcirculação do tecido manipulado estavam em condições normais (não inflamados – ausência do extravasamento do FITC-dextran), garantindo condições fisiológicas adequadas e estáveis para a realização do experimento. Cabe ressaltar que esse passo é fundamental para o decorrer do experimento tendo em vista que se o tecido da BBH apresentar qualquer aumento na permeabilidade dos vasos durante o período de estabilização (-30 min) essa preparação estará comprometida.

Sendo assim, após a estabilização do tecido, a histamina foi adicionada na perfusão (5mL/min) na concentração de 4 μ M e mantida por 5 minutos. Após esse período, a preparação foi mantida apenas com o meio de perfusão. Ao longo desses 5 minutos, observou-se um aumento progressivo da permeabilidade vascular e dilatação dos vasos, atingindo o pico aos 7 minutos após a aplicação da histamina. O extravasamento decai aos 10 minutos, retornando ao um estado basal (30 min) ligeiramente acima daquele registrado no início da experiência. Em seguida, a histamina foi reaplicada em perfusão por mais duas vezes tal como descrito acima. Nestas condições, a histamina induziu o mesmo padrão de indução de extravasamento de plasma e dilatação dos vasos (Figura 8 A). No decorrer do experimento, imagens foram capturadas para mostrar a marcação dos vasos com FITC no período de estabilização e do extravasamento de plasma nos períodos posteriores às aplicações da histamina até a homeostasia do tecido (Figura 8B).

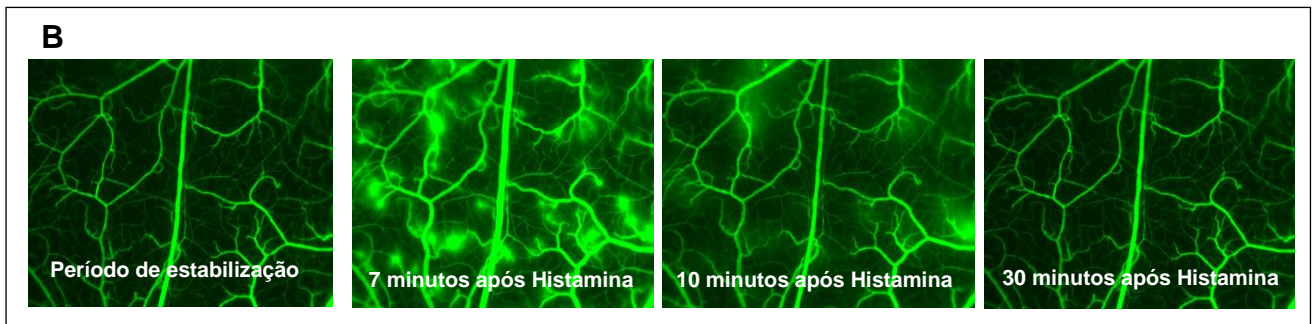
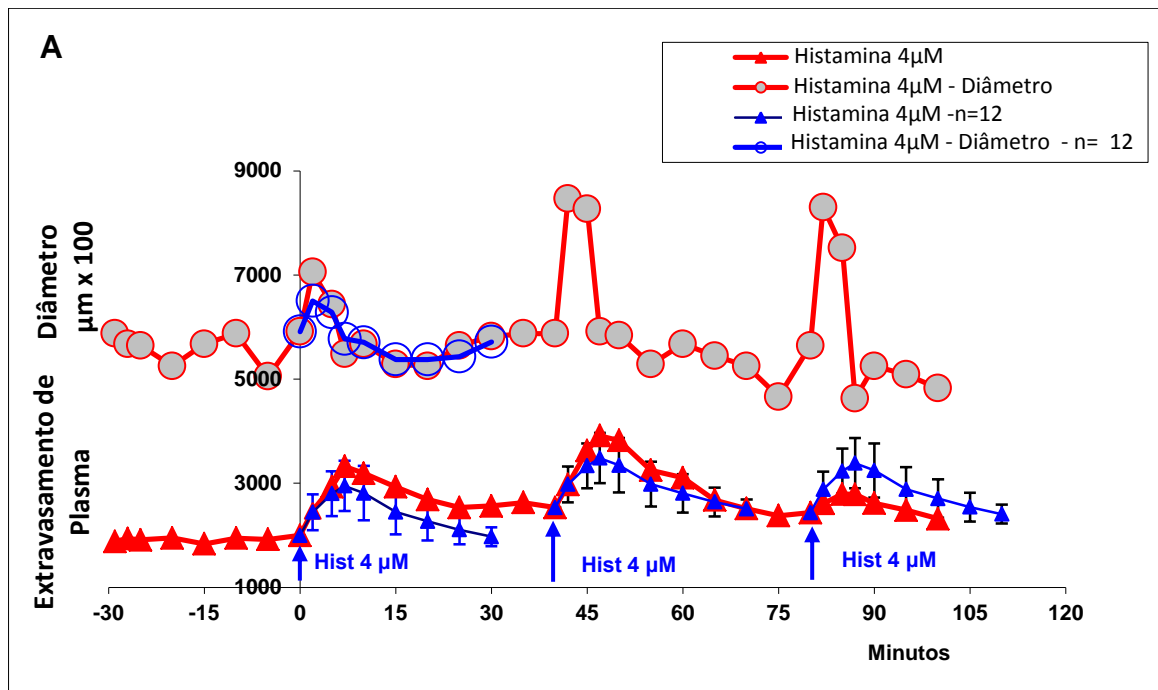


Figura 8: Utilização da histamina como controle interno da técnica para obter uma resposta positiva da microcirculação. (A) Após o período de estabilização, aplicou-se a histamina na concentração de 4 µM durante 5 min por meio da perfusão. Durante esses 5 minutos observou-se um aumento da permeabilidade vascular e dilatação das arteríolas. Após a primeira aplicação da histamina e ao final de 30 minutos o tecido retorna a homeostasia. Em seguida, mais duas aplicações são realizadas nas mesmas condições anteriores respeitando os intervalos de normalidade do tecido (vermelho). Esses dados corroboram aos registros típicos da média de experimentos com histamina 4µM (azul). **(B)** Imagens sequenciais da marcação com FITC no período experimental.

5.2- Padronização do protocolo de aplicação tópica na microcirculação e novas abordagens na medição da intensidade de fluorescência

Para possibilitar a aplicação da técnica de microscopia intravital em modelos de infecção envolvendo aplicação tópica de patógenos foi necessário ajustar o protocolo até então estabelecido, já que a retomada da perfusão (i) reduz o tempo de interação dos micro-organismos com o tecido (ii) provoca gasto excessivo de reagentes devido ao grande volume requerido na perfusão. Para melhorar a eficiência deste procedimento testamos duas formas de aplicação tópica no mesmo experimento. Após a estabilização do animal, a perfusão (5 ml/min) foi interrompida, aplicando-se topicamente 500 μ l do tampão (solução salina tamponada com bicarbonato e HEPES) por 7 min, para comprovar que o tecido encontra-se em estado basal, i.e., não apresenta aumento de permeabilidade vascular. Cabe ressaltar que ao longo destes 7 minutos, observamos um aumento da fluorescência causado pela suspensão da perfusão. Este efeito reflete acúmulo do marcador (FITC-dextran) no tecido da bochecha do hamster, ou seja, o traçador fluorescente não é eliminado pela perfusão que, portanto, assemelha-se a uma linfodrenagem artificial. É importante ressaltar que decorridos os 7 minutos, o fluxo é retomado e a fluorescência volta ao nível normal após 10 minutos decorridos da aplicação. Em seguida a histamina foi aplicada duas vezes no mesmo experimento. A primeira envolveu aplicação tópica na concentração de 4 μ M em 500 μ L do tampão por 7 minutos com a perfusão interrompida. Após esse tempo, o fluxo foi normalizado. A segunda aplicação foi com histamina na mesma concentração de 4 μ M por 7 minutos, sendo que neste caso a perfusão com o tampão foi retomada. Durante os 7 minutos seguintes, observamos um aumento significativo do extravasamento de plasma nos dois tipos de aplicação, indicando que não há diferenças significativas entre as formas de aplicação (Figura 9).

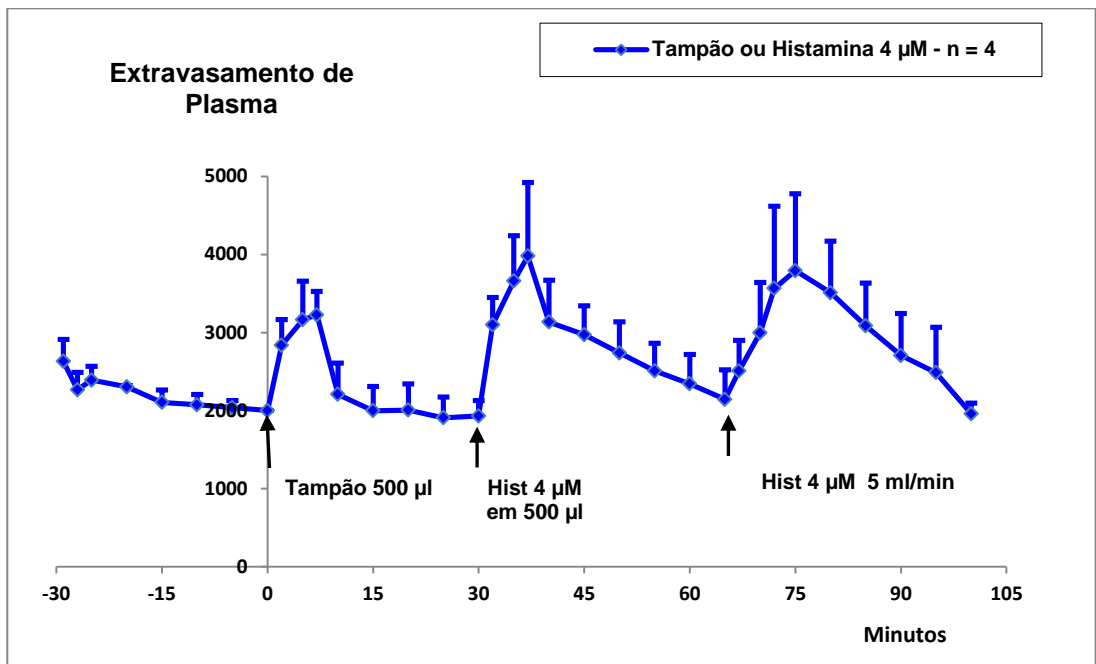


Figura 9: Médias e desvio padrão dos resultados em BBH de 4 hamsters. Depois dos 30 min de controle sem aumento do extravasamento, a perfusão foi interrompida e o BBH recebeu 500 μ l do tampão. Aos 30 minutos, 500 μ l da histamina 4 μ M foi aplicado de forma tópica por 7 min e aos 70 min, a preparação foi sensibilizada com histamina 4 μ M durante 7 minutos no liquido de perfusão. O gráfico mostra que a resposta máxima da histamina em 500 μ l aos 30 min (aplicação tópica) e aos 70 min (histamina mantida na perfusão) não são diferentes (n=4).

O extravasamento vascular iniciado por mediadores como, por exemplo, a histamina é resultado na formação de aberturas (gaps) formadas entre as células endoteliais da região de vênulas pós-capilares (Majno e Palade, 1961). Com isso, avaliamos os dados anteriores da BBH e selecionamos algumas vênulas pós-capilares em áreas circulares com diâmetro de 100 μm e área de 0.008 mm^2 durante as reações inflamatórias do experimento acima com o auxílio de uma ferramenta disponível no programa Axio Vision 4.4 Software (Carl Zeiss, Germany) capaz de medir pontualmente a fluorescência em determinadas áreas selecionadas. Em seguida, calculou-se a média da intensidade de fluorescência das áreas com vênulas pós-capilares, para demonstrar que a permeabilidade vascular caracterizada pelo extravasamento do marcador FITC-dextran ocorre intensamente em vênulas pós-capilares. Além disso, comparamos esses valores com a intensidade de fluorescência captada da área total (5 mm^2) do mesmo experimento (Figura 10). A figura 10 mostra que é possível selecionar áreas circulares (raio de 150 μm aproximadamente) dentro da imagem da área total (5 mm^2) para fazer a medição de fluorescência.

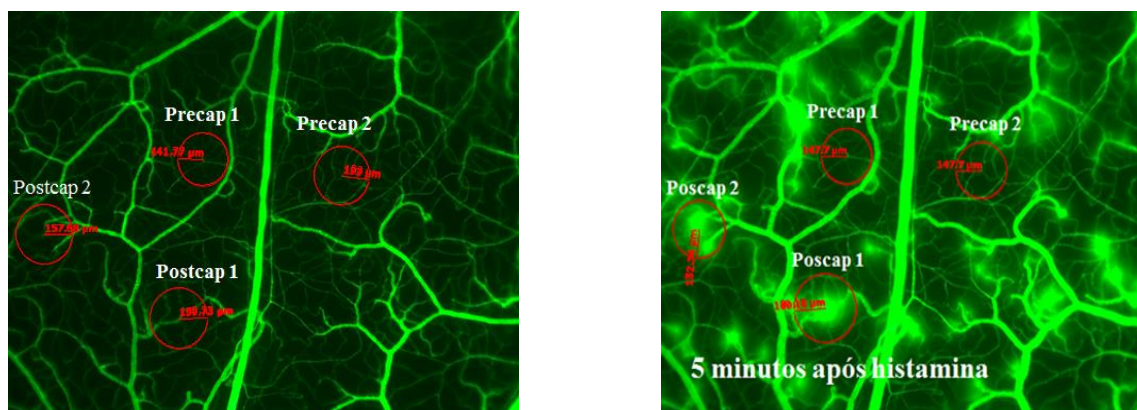


Figura 10: Comparação da intensidade de fluorescência na área total da imagem (5 mm^2) e em áreas menores (0.008 mm^2) das vênulas pós-capilares. Imagens antes e depois da aplicação de histamina mostrando que é possível selecionar áreas compostas por arteríolas terminais e capilares (precap 1 e 2) e áreas compostas por vênulas pós capilares (poscap 1 e 2) para medir fluorescência de FITC-dextran em áreas menores (raio de 150 μm) da área de 5 mm^2 .

Os resultados demonstram que a aplicação tópica de 500 μ l do tampão, a fluorescência aumenta semelhantemente em áreas circulares (0.008 mm²) e na área total (5 mm²). Comparando-se análise da aplicação tópica da histamina com a perfusão interrompida versus histamina mantida na perfusão, observou-se maior intensidade de fluorescência das vênulas pós-capilares (0.008 mm²) em relação à intensidade de fluorescência da área total (5 mm²) selecionada no mesmo experimento. Dessa forma, novos critérios de aferição da intensidade média de fluorescência de vênulas pós - capilares foram estabelecidos (Figura 11 A). Ao excluir os valores durante a parada da perfusão, a figura 11 B mostra que a aplicação do tampão controle não aumenta inespecificamente a permeabilidade nas áreas analisadas. Entretanto, quando a histamina é aplicada neste tampão, observamos um aumento pontual nas vênulas pós-capilares (0.008 mm²) que foram acima da média de intensidade de fluorescência na área total (5 mm²) (Figura 11 B).

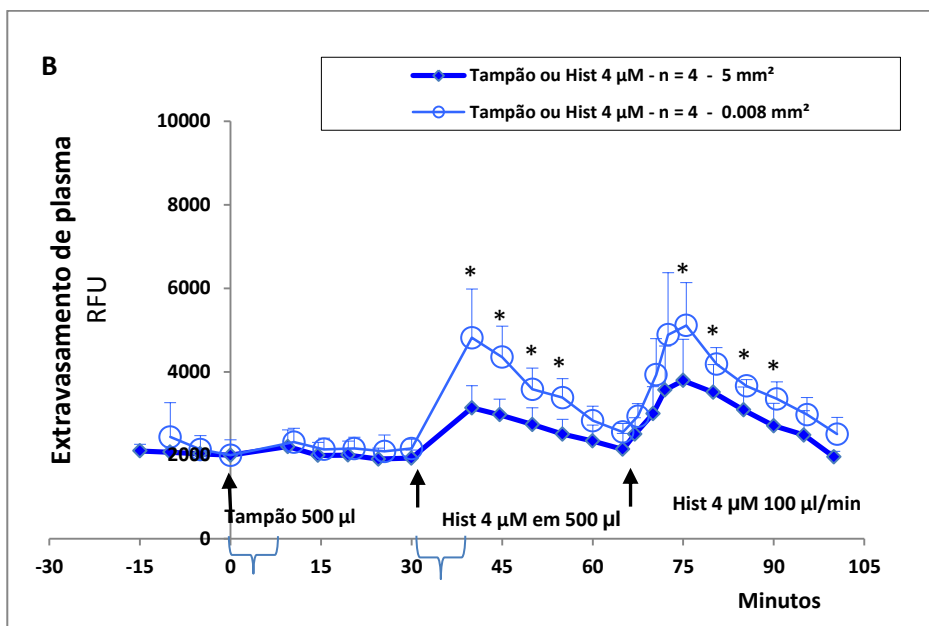
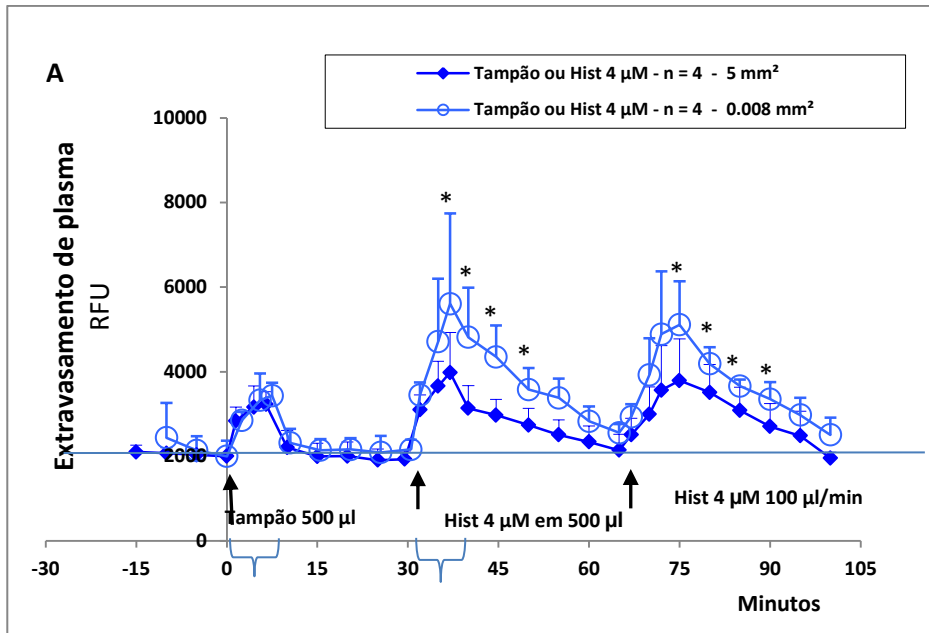


Figura 11: Comparação da intensidade de fluorescência (RFU) na área total das imagens (5 mm², quadrado azul) e em áreas selecionadas dentro da imagem - vênulas pós-capilares (VPCs - 0.008 mm², círculo azul). (A) A média da fluorescência (RFU) das áreas com vênulas pós-capilares (0.008 mm²) e área total (5 mm²) são semelhantes após a aplicação do tampão mas difere após a aplicação da histamina (* p < 0.05 as 10,15, 20 e 25 min depois Hist 4 µM). (B) Quando os valores durante o período da parada da perfusão (0 -7 min e 30 – 37 min) foram eliminados do gráfico, fica mais claro visualizar que o tampão não aumenta permeabilidade das vênulas pós-capilares. As análises estatísticas mostraram que não há diferença significativa (p > 0.05) entre valores da fluorescência das áreas 0.008 mm² e 5 mm² durante aplicação o tampão mas tem durante aplicação da histamina (* p < 0.05). Além disso, não há diferenças significativas entre valores do extravasamento induzidas com Hist 4 µM em 500 µl comparados com Hist 4 µM em perfusão.

5.3- Aplicações da técnica de Microscopia Intravital

Dados anteriores do Laboratório de Imunologia Molecular demonstram que o LPS e a gingipaína, uma cisteína protease da *P. gingivalis*, respectivamente, ligante de TLR2 e protease liberadora de cinina, ativam o eixo TLR2/B2R e amplificam a inflamação ao mesmo tempo em que ativam receptores de bradicinina de subtipo B2 expressos por células dendríticas, direcionando o perfil da resposta adaptativa para o perfil TH1 (C57BL/6) ou perfil misto TH1/TH17 (Monteiro *et al.*, 2009). Em linhas de investigação independentes, foi documentado que ATP liberado a partir de células infectadas ou células estressadas em locais de inflamação alerta o sistema imune inato para a presença de uma infecção (Surprenant *et al.*, 1996; Schwiebert e Zsemberly, 2003; Khakh e North, 2006; Mariathasan e Monack, 2007). Visando estudar as relações funcionais entre receptores purinérgicos e receptores de bradicinina na periodontite, adaptamos um modelo de infecção tópica previamente padronizado com a cepa W83 *P. gingivalis* (Monteiro *et al.*, 2009) para a cepa *P. gingivalis* 381. Empregando doses variáveis (1×10^6 , 1×10^8 , 1×10^9 e 1×10^{10}) e o ATP (1 μ M, 5 μ M, 10 μ M), analisamos o extravasamento de plasma e o diâmetro dos vasos em relação às diferentes concentrações aplicadas topicamente na bolsa da bochecha. Após 30 minutos da estabilização dos animais ao procedimento cirúrgico, interrompemos o fluxo e aplicamos as diferentes concentrações de bactéria ou ATP na bolsa, respeitando os períodos de homeostasia do tecido.

Nossos resultados mostram que *P. gingivalis* 381 (Figura 12) induz aumento da permeabilidade vascular no tecido da BBH de forma dose dependente (Figura 12). Em outra série experimental, verificamos que diferentes concentrações de ATP aplicadas topicamente na bolsa foram capazes de induzir extravasamento e uma dilatação dos vasos de forma dose dependente (Figura 13).

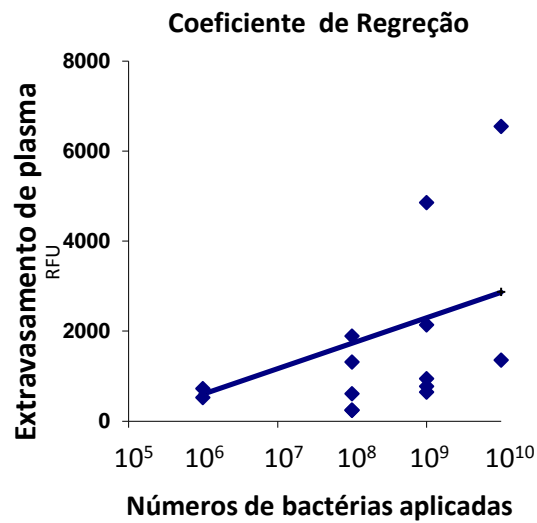


Figura 12: Dose resposta para *P.gingivalis* 381. Os seis hamsters receberam diferentes concentrações da bactéria *P. gingivalis* 381 (1×10^6 , n = 2; 1×10^8 , n = 4; 1×10^9 , n = 5 e 1×10^{10} , n = 2) de forma tópica por 7 minutos em intervalos de tempos diferentes. Aos 10 minutos após aplicação a dose 10^{10} induziu um aumento significativo se comparado com a dose 10^6 (n = 14 total).

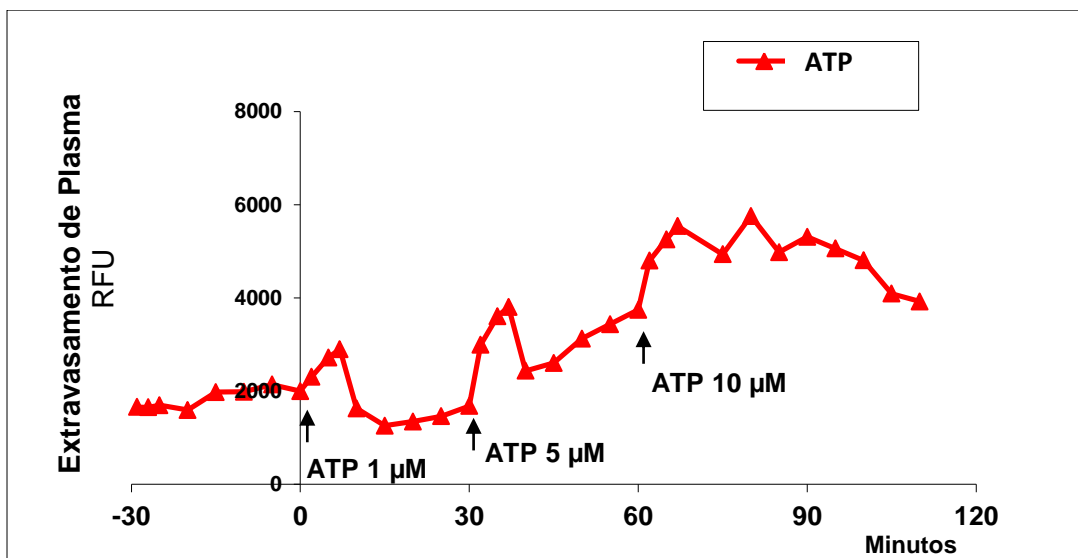


Figura 13: Dose resposta para ATP. Os HCPs receberam diferentes concentrações de ATP (1 μ M, 5 μ M e 10 μ M) de forma tópica por 7 minutos em intervalos de tempos diferentes. O extravasamento de plasma (vermelho) foi medido e representado no gráfico. Dado representativo de 2 experimentos.

Os resultados mostrados na figura 13 evidenciam o aumento de permeabilidade vascular prolongado após a aplicação de ATP 10 μ M. Este resultado nos levou a suspeitar que mastócitos poderiam ser ativados por ATP, secretando histamina, que por sua vez poderia amplificar a resposta edematogênica. Para investigar esta possibilidade, os animais foram ou não pré-tratados com cromoglicato (inibidor de degranulação de mastócitos – 40 mg/Kg) 1h e 30 min antes do experimento. Após a preparação e estabilização dos animais, os resultados em dois hamsters com aplicação da histamina 4 μ M por quatro vezes no intervalo de 30 minutos, mostraram que, conforme esperado, o cromoglicato não interferiu com a resposta da histamina (Figura 14 A). Entretanto, verificamos que a resposta microvascular prolongada induzida por 10 μ M de ATP (anteriormente observada nos controles) foram inibidas em animais tratados com cromoglicato, sugerindo a participação dos mastócitos nessa reação inflamatória induzida por ATP (Figura 14 B). As alterações das arteríolas (dilatação) foram semelhantes às alterações relacionadas ao extravasamento nas vênulas pós capilares (Figura 14 C).

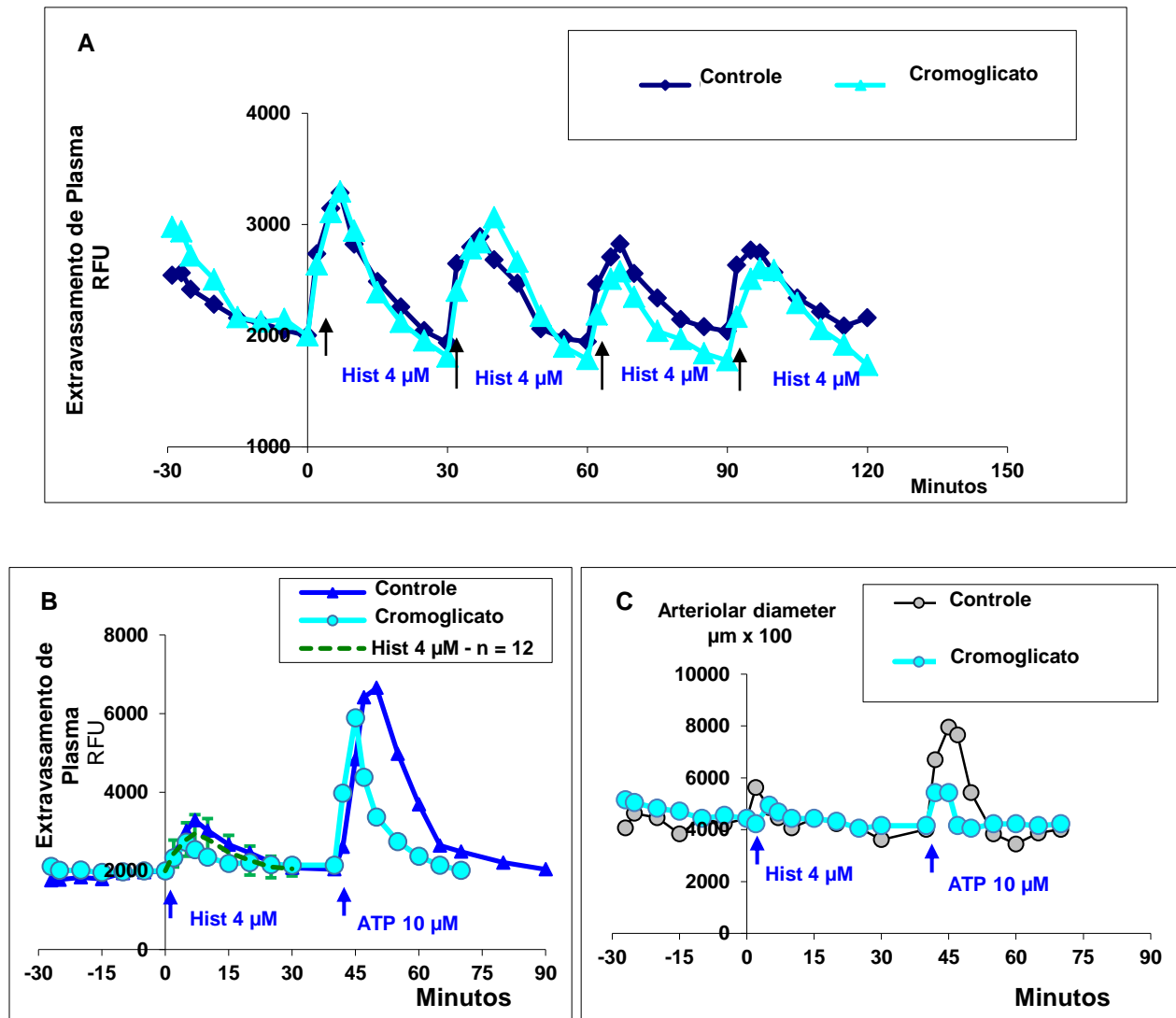


Figura 14. Cromoglicato não interfere no efeito causado pela histamina e inibi o efeito do ATP 10 μM . Os hamsters foram ou não pré-tratados com cromoglicato (40 mg/Kg) 1 h e 30 min antes. **(A)** após o período de estabilização a histamina 4 μM foi aplicada por quatro vezes respeitando o intervalo de 30 min e o hamster tratado (azul claro) ou não (azul escuro) com cromoglicato foram capazes de induzir o extravasamento de forma semelhante. **(B e C)** A histamina 4 μM foi aplicada por 5 minutos e após a recuperação do tecido, o ATP 10 μM em 500 μl foi aplicado por 5 min. Observamos um efeito inibidor do cromoglicato no prolongamento causado pelo ATP 10 μM assim como na dilatação dos vasos. Dado representativo de 2 experimentos.

Diversos estudos sobre os mastócitos confirmam que essas células tendem a se acumular em torno dos microvasos em uma variedade de espécies e tecidos. Raud descreve um estudo sobre reações inflamatórias dependentes de mastócitos provocada pelo composto 48/80 no estudo da microscopia intravital na BBH envolvendo extravasamento de plasma e migração dos leucócitos exclusivamente das vênulas pós-capilares (Raud *et al.*, 1989). Posteriormente a essa informação, avaliamos a participação efetiva dos mastócitos na capacidade que seus grânulos têm como agentes mediadores inflamatórios e como essa célula poderia modular a inflamação causada pela *P.gingivalis*. Para isso, os animais foram pré-tratados ou não com cromoglicato (40 mg/Kg) 1 h e 30 min antes do experimento seguindo os mesmos critérios de estabilização. Em seguida, aplicamos a histamina 4 μ M por 5 minutos na perfusão a fim de obter um controle positivo da microcirculação. Após a homeostasia, aplicou-se topicamente as concentrações de 3 μ g/mL e 30 μ g/mL do composto 48/80 que é capaz de induzir a degranulação dos mastócitos. Nos animais controle ou tratado com cromoglicato, a histamina induziu de forma semelhante o aumento da permeabilidade vascular. As concentrações 3 μ g/mL e 30 μ g/mL do composto 48/80 nos animais controles foram capazes de induzir o aumento da permeabilidade vascular, já os animais tratados com cromoglicato o efeito foi inibido. Depois uma segunda dose na concentração de 30 μ g/mL foi aplicada e o nível de permeabilidade provocada pelo composto, foi a baixo da resposta da permeabilidade quando comparada com a primeira aplicação da concentração de 30 μ g/mL, indicando uma atenuação dos mastócitos pelo composto 48/80 havendo uma excessiva degranulação destes pelas aplicações anteriores. (Figura 15).

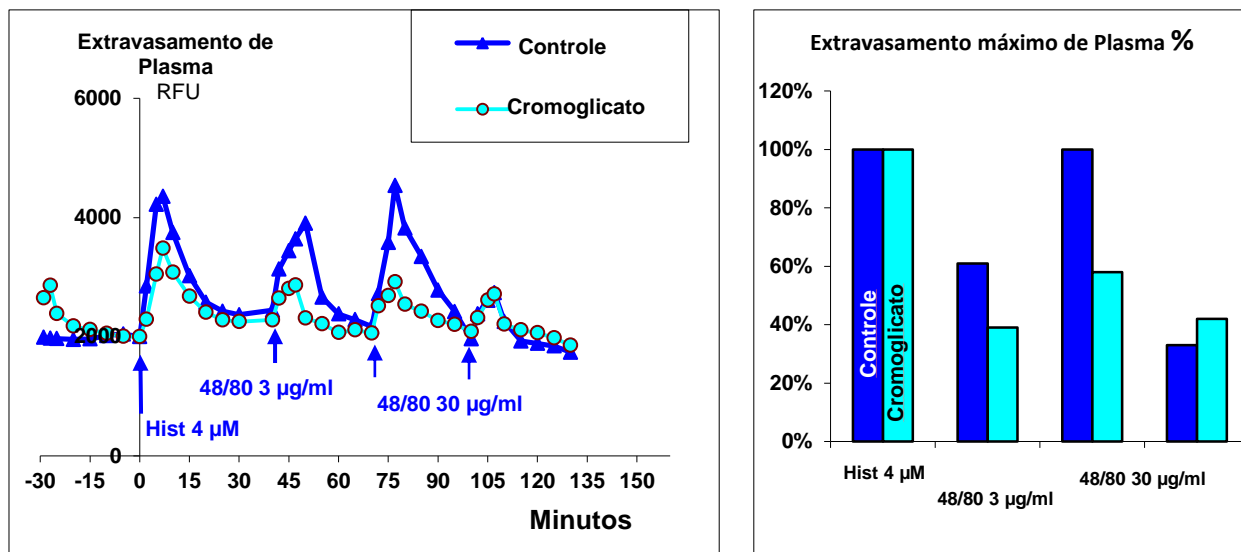


Figura 15: Cromoglicato pode inibir os efeitos de 48/80 (3 μ g/ml e 30 μ g/ml). Os animais foram (azul claro) ou não (azul escuro) pré-tratados com cromoglicato (40mg/kg) 1h e 30 min antes da aplicação da histamina. Após o período de estabilização, iniciamos a aplicação com histamina 4 μ M por 5 minutos na perfusão e depois da homeostasia do tecido, aplicou-se topicamente as concentrações de 3 μ g/ml e 30 μ g/ml do composto 48/80 (induz a degranulação dos mastócitos). Dado representativo de 2 experimentos.

Tendo em vista que as fímbrias são importantes fatores de virulência capazes de induzir respostas inflamatórias como aumento da permeabilidade vascular e dilatação dos vasos sanguíneos, fomos avaliar o papel da fímbria na indução do extravasamento de plasma. Para isso, utilizamos duas cepas de *P. gingivalis*, a cepa 381 como controle (selvagem) e a cepa DPG3 (nocaute para fímbria). Utilizando o modelo BBH, aplicamos de forma tópica 500 μ l da bactéria 381 ou DPG3 na concentração de 1×10^8 por 7 minutos com a perfusão interrompida. Observamos que as bactérias selvagens 381 (rosa, amarelo e vermelho) foram capazes de induzir um maior extravasamento de plasma em três animais, no entanto as bactérias nocautes para fímbria DGP3 (azul) apresentam menor capacidade inflamatória, confirmando assim as propriedades inflamatórias das fímbrias no tecido da bochecha do hamster (Figura 16).

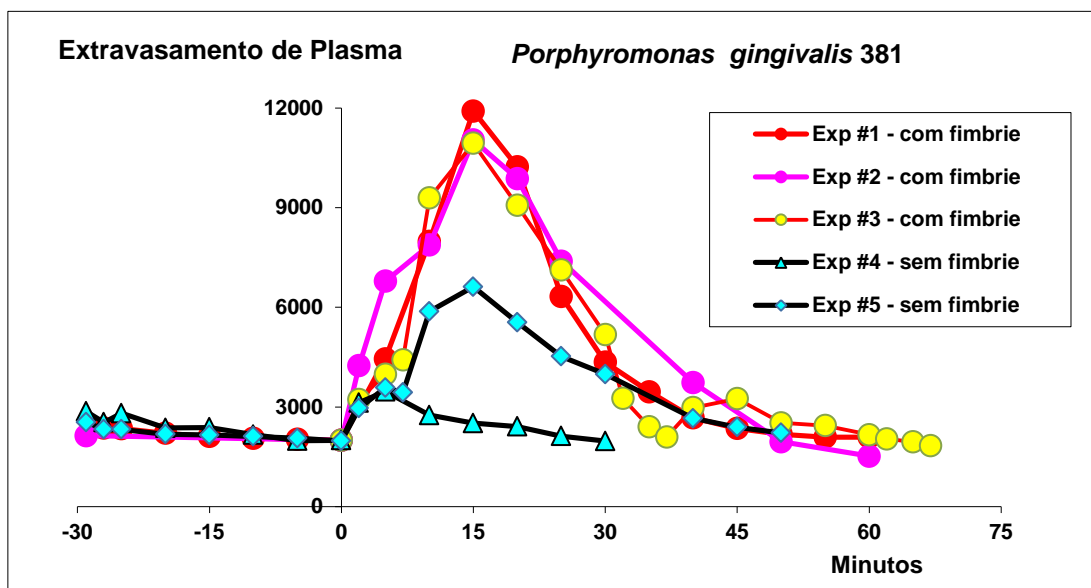


Figura 16: A fímbria da bactéria é importante na capacidade de aumentar a permeabilidade vascular. Cinco hamsters foram preparados para microscopia intravital e após os 30 minutos de estabilização, aplicou-se de forma tópica na BBH 10^8 da *P.gingivalis* em 500 μ l. Três hamsters receberam *P. gingivalis* 381 (com fimbria) e dois hamsters receberam a cepa de *P. gingivalis* DPG3 (sem fimbria). A aplicação da *P. gingivalis* 381 de forma tópica por 8 minutos, aumentou o extravasamento de plasma até 11300 RFU (média) que foi três vezes maior do que a média do efeito da bactéria DPG3, 6220 e 3583 RFU. Os resultados sugerem que o modelo BBH é sensível para observar diferenças na capacidade de gerar extravasamento de plasma induzido pela bactéria e que o BBH pode ser usado para estudar os mecanismos das bactérias no processo inflamatório.

Posteriormente a esses resultados, avaliou-se a participação dos mastócitos no contexto da infecção causada pela *P.gingivalis* 381. Então, os animais foram ou não pré-tratados com cromoglicato (40mg/Kg) 1h e 30 min antes da realização do experimento, seguindo sempre as condições de estabilidade. Após este período, aplicou-se de forma tópica a *P. gingivalis* na concentração de (1×10^9) em 500 μ l do tampão por 7 minutos e quando o tecido voltou a homeostasia aplicou-se a histamina 4 μ M por 5 minutos na perfusão. A *P. gingivalis* foi capaz de induzir um aumento significativo de permeabilidade vascular nos animais controles, já os animais tratados com cromoglicato, eles apresentaram redução dessa resposta, sugerindo assim que o cromoglicato foi capaz de inibir a degranulação dos mastócitos presentes na BBH e confirmando sua contribuição para o aumento da permeabilidade vascular induzida

pela *P. gingivalis*. A resposta da histamina como controle interno ao final do experimento foi semelhante para ambos os animais (Figura 17).

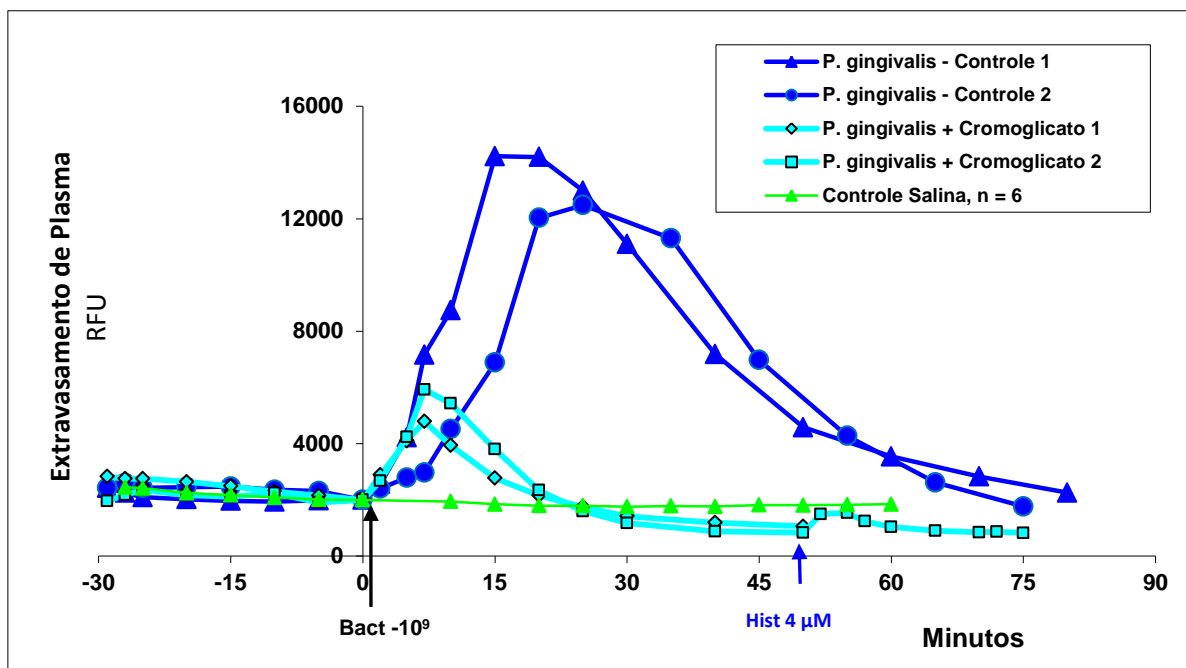


Figura 17: Cromoglicato reduz a permeabilidade vascular causada pela *P. gingivalis* 381. Os animais foram (azul claro, n=2) ou não pré-tratados (azul escuro, n=2) com cromoglicato (40 mg/kg) 1h e 30 min antes da aplicação das bactérias. Após o período de estabilização, aplicou-se topicamente no tecido 10^9 da *P. gingivalis* 381 em 500 μ l por 7 minutos com perfusão parada. Um dos hamsters tratado com cromoglicato foi testado com histamina 4 μ M superfundida por 5 min como controle positivo.

6. Discussão

A microscopia intravital e seu sistema de imagem estão cada vez mais sendo utilizados tanto para fins experimentais quanto clínicos. A técnica em particular, tem proporcionado avanços na qualidade de imagem óptica e no desenvolvimento de ferramentas moleculares e fluorocromos mais eficientes (Weigert, 2010; Ritsma, 2012). Sua resolução espacial e temporal é alta quando combinada com a sua profundidade de penetração e capacidade de visualização proporcionando uma técnica acurada para estudos de imagem *in vivo*.

De fato, esta técnica proporciona aos cientistas uma ferramenta útil e é preciso considerar que como em qualquer técnica cirúrgica, há certas vantagens e desvantagens de usar uma determinada peça de tecido. Provavelmente o ponto positivo é combinar a análise microscópica com um ambiente *in vivo* juntamente com a alta resolução espacial e temporal. Já os pontos negativos, estão associados à ativação potencial de células por manipulação cirúrgica por ser uma técnica invasiva (Granger & Schmid-Schonbein, 1995), é necessário tempo para a experimentação e possui uma profundidade de penetração limitada (μm – mm) (Kenne e Lindbom, 2011).

Diversos modelos tem sido o cenário para o estudo da microcirculação, dentre esses a técnica de microscopia intravital do tecido exteriorizado como, por exemplo, o modelo da BBH tem tornado evidente a localização precisa dos sítios de extravasamento (leakage) nas vênulas pós-capilares em respostas a mediadores inflamatórios (Svensjö e Grega, 1979). Com isso desenvolvemos uma metodologia usando a microscopia intravital para avaliar os mecanismos envolvidos na integração entre a microcirculação e o sistema imune inato.

Um estudo clássico de microscopia eletrônica por Majno e Palade nos revelou que em vênulas pós-capilares de 20 a 30 μm de diâmetro, partículas de carbono extravasam através de aberturas (gaps) formadas entre as células endoteliais como resultado da estimulação e contração dessas células provocada pela histamina (Majno e Palade, 1961). Essa evidência nos levou a utilizar a histamina como um controle interno positivo para padronizar uma nova forma de aplicação tópica e

medição da intensidade de fluorescência em vênulas pós-capilares no modelo da microcirculação da BBH.

Confirmamos que a histamina 4 μM na perfusão é capaz de induzir o aumento da permeabilidade vascular e dilatação dos vasos ao longo de 5 minutos e quando retirada da perfusão seus efeitos são reversíveis. Logo, as aplicações consecutivas da histamina 4 μM demonstraram que o tecido é responsivo mesmo após um primeiro estímulo. Isso se deve às concentrações adequadas utilizadas no modelo sem que haja um estímulo excessivo a ponto de dessensibilizar o tecido. Em seguida, padronizamos um controle para forma de aplicação tópica, interrompendo a perfusão com a finalidade de impedir a “drenagem artificial” dos reagentes limitados ou de micro-organismos que dependem da interação com o tecido para disparar uma resposta inflamatória. A aplicação tópica com o tampão mostrou um aumento da fluorescência que provavelmente é a soma da fluorescência dos vasos dilatados e o acúmulo do marcador FITC-dextran no tecido devido à parada do fluxo, ou seja, o fluxo constante da perfusão remove continuamente os compostos solúveis, tais como FITC-dextran a partir de tecidos. Já o uso da histamina como controle positivo na microcirculação foi capaz de induzir um aumento da permeabilidade vascular para as duas formas de aplicação (tópica e mantida na perfusão) de maneira semelhante, garantindo um controle positivo adequado para o estudo das interações entre o tecido e micro-organismos, assim como informações valiosas sobre o efeito de uma droga nesses parâmetros sistêmicos.

Analisando esse mesmo experimento, propomos uma nova medida pontual das vênulas pós-capilares (0.008 mm^2) e constatamos que a média da intensidade de fluorescência nas vênulas é mais intensa se comparadas com a área total de medição (5 mm^2), o que explica a inflamação ser caracterizada pelo aumento da permeabilidade microvascular de proteínas do plasma e recrutamento de leucócitos nos sítios infamatórios de vênulas pós-capilares, mas não em arteríolas ou capilares (Svensjö, 2006). É importante ressaltar que ao diminuir a área da medida de 5 mm^2 para um círculo com raio de $50 \mu\text{m}$ ($= 0.008 \text{ mm}^2$) obtendo quase que exclusivamente vênulas pós-capilares, aumenta-se a seletividade do método e aumenta-se a possibilidade de detectar pequenas alterações na permeabilidade vascular.

Após a padronização dos controles para aplicação tópica, realizamos então uma dose resposta com a *P.gingivalis* 381 (1×10^8 , 1×10^9 e 1×10^{10}) e o ATP (1 μ M, 5 μ M e 10 μ M). Os resultados indicam que as diferentes concentrações da *P.gingivalis* 381 induziram o aumento da permeabilidade vascular de maneira dose dependente assim como as diferentes concentrações de ATP. No entanto, ao analisar a dose resposta com ATP, observamos um aumento no tempo de extravasamento para a concentração de 10 μ M, o que nos possibilitou sugerir que após as aplicações decorrentes das diferentes concentrações de ATP, a resposta para a concentração de 10 μ M poderia estar sendo sustentada pela participação dos mastócitos sendo estes ativados pelo ATP exógeno através dos receptores purinérgicos do tipo P2 promovendo a degranulação e consequentemente liberação dos mediadores inflamatórios que podem atuar no endotélio potencializando a resposta inflamatória ou induzindo células sentinelas a secretar quimiocinas levando ao recrutamento de leucócitos para os sítios inflamatórios (Piccini *et al.*, 2008; Hyman *et al.*, 2009). Enquanto alguns autores propõem que o ATP liberado para os sítios inflamatórios não tem função de um quimioatraente, outros sugerem que células apoptóticas liberam ATP através de panexina-1 e que o próprio ATP atua como um poderoso sinal de “encontra-me” que recruta monócitos (Elliott *et al.*, 2009; Chekeni *et al.*, 2010). Portanto, inúmeras evidências indicam a importância da sinalização purinérgica atuando no sistema imune tanto no combate aos patógenos quanto na resolução da inflamação.

A interação entre a *P.gingivalis* com os tecidos ocorre inicialmente através das fímbrias que são importantes fatores de virulência envolvidos na aderência e invasão de células do hospedeiro (Chou *et al.*, 2005). Com base nesta informação, utilizamos então duas cepas de *P.gingivalis*, a cepa 381 como controle (selvagem) e a cepa DPG3 (nocaute para fímbria) e observamos que a cepa DPG3 apresenta menor capacidade inflamatória se comparada com a cepa selvagem 381 confirmando assim a importância desse fator de virulência no processo de permeabilidade vascular aumentada. Após estes resultados verificamos então a participação efetiva dos mastócitos no contexto da inflamação causada pela *P.gingivalis*. Para isso, os animais foram ou não pré-tratados com cromoglicato ou 48/80. O tratamento com o cromoglicato e a aplicação tópica do composto 48/80 inibiu e induziu a degranulação dos mastócitos respectivamente sugerindo uma

contribuição dos mastócitos na geração ou liberação de sinais de perigo no contexto da permeabilidade vascular induzida pela *P.gingivalis*.

Ao estudar o processo inflamatório causado pela *P.gingivalis*, sugerimos um modelo com base no estudo publicado em que a *P. gingivalis* é capaz de induzir inflamação, quando injetadas na pata ou intrabucalmente (fundo do vestibulo), através da ativação de TLR2/B2R. Neste trabalho, foi demonstrado que o aporte de plasma para o interstício é precedido pela ativação de TLR2 pelo LPS e que animais deficientes em TLR2 ou B2R, depletados de células polimorfonucleares ou animais selvagens infectados com bactérias nocautes para as gingipaínas R, não desenvolveram a gengivite (Monteiro *et al.*,2009). É importante ressaltar que a gingipaína, uma cisteíno protease da *P.gingivalis*, é capaz de processar o cininogênio de alto peso molecular (HK) levando a liberação de sinais de perigo como a BK que amplifica o processo inflamatório conduzindo ao aumento de permeabilidade vascular. Adicionalmente, que o ATP liberado de células danificadas, estressadas ou até mesmo pela degranulação dos mastócitos que são encontrados na periferia dos vasos pode agir cooperativamente com a BK intensificando os processos imunopatológicos que culminam em doença periodontal.

Estes dados provavelmente vão permitir o desenvolvimento e aprofundamento do projeto levando a novos métodos para que a técnica de microscopia intravital possa avançar nas performances como, por exemplo, na preparação cirúrgica em mesentérios, o que nos permitirá o estudo com camundongos nocautes, correlacionar à função de migração e adesão no aumento de permeabilidade utilizando um marcador fluorescente - rodamina, avaliar e demonstrar eventos como a degranulação de mastócitos na BBH e no mesentério através da microscopia pela coloração de seus grânulos com azul de toluidina ou vermelho de rutênio e avaliar efetivamente a participação da sinalização purinérgica no contexto da inflamação causada pela *P. gingivalis*.

A metodologia estabelecida nesta tese já foi empregada em alguns artigos científicos (Schmitz *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2012 e Andrade *et al.*, em preparação), o que demonstra a importância da padronização da aplicação tópica no aprimoramento dos projetos desenvolvidos no laboratório. Além disso, nos possibilitou elaborar uma metodologia de estudo sobre angiogênese provocada pela infecção de parasitas marcados com GFP (Green Fluorescent Protein) na BBH.

7. Conclusão

O uso da técnica de microscopia intravital juntamente com a aplicação do marcador de plasma FITC-dextran possibilitou:

- 1- Padronização de uma aplicação tópica na BBH em pequenos volumes (500 μ l), permitindo estudar a interação dos micro-organismos com a microcirculação, além da utilização de reagentes de forma direta no tecido.
- 2- Novos critérios de aferição da intensidade média de fluorescência em vênulas pós-capilares foram estabelecidas.
- 3- Analisar e avaliar mudanças na permeabilidade vascular causada pela bactéria *P. gingivalis* em que sugerimos um modelo no qual a participação dos sinais de perigo como ATP e BK, juntamente com mastócitos podem agir cooperativamente intensificando os processos inflamatórios causado na BBH.

8. Bibliografia

AIRD, W.C. Endothelium as an organ system. *Crit Care Med.* 2004; 32(5): S271-S279.

Andrade, D; Serra, R; Svensjö, E; Lima, AP; Ramos, E.S Jr, *et al.* Trypanosoma cruzi invades host cells through the activation of endothelin and bradykinin receptors: a converging pathway leading to chagasic vasculopathy. *Br J Pharmacol.* 2012; 165(5):1333-1347.

BERNE, R.M; LEVY, M.N; KOEPPEN, B.M; STANTON, B.A. Fisiologia. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda. 2004; 277-398.

BORON, W.F E BOULPAEP, E.L. Medical physiology, 2nd ed. Saunders, Philadelphia. 2008.

BURNSTOCK, G . Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64:1471–1483.

CHEKENI, F.B; ELLIOTT, M.R; SANDILOS, J.K; WALK, S.F; KINCHEN, J.M. *et al.* Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature.* 2010; 467(7317):863-867.

CHOU, H.H; YUMOTO, H; DAVEY, M; TAKAHASHI, Y; MIYAMOTO,T. *et al.* Porphyromonas gingivalis fimbria-dependent activation of inflammatory genes in human aortic endothelial cells. *Infect Immun.* 2005; 73(9):5367-5378.

DAHLQUIST, R; DIAMANT, B. Interaction of ATP and calcium on the rat mast cell: effect on histamine release. *Acta Pharm Toxicol (Copenh).* 1974; 34:368–384.

DI VIRGILIO, F; CHIOZZI, P; FERRARI, D. *et al.* Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood.* 2001; 97:587–600.

DODD, L.R E JOHNSON, P.C. Diameter changes in arteriolar networks of contracting skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1991; 260: H662 – H670.

DULING, B. R. The preparation and use of the hamster cheek pouch for studies of the microcirculation. *Microvasc. Res.* 1973; 5: 423-429.

ELLIOTT, M. R. *et al.* Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature.* 2009; 461, 282–286.

GALLI, S.J; TSAI, M. Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *J Dermatol Sci.* 2008; 49:7–19.

GIBSON, F.C; GENCO, C.A. The genes *Porphyromonas*. In: Dworkin, M; Falkow, S; Rosenberg, E; Schleifer, K.H, Stackebrand, E. The prokaryotes 3rd ed vol 7. *Springer Science Business Media*. 2006; 428-454.

GRANGER, D. N., E SCHMID-SCHONBEIN, G. Physiology and pathophysiology of leukocyte adhesion. New York: Oxford University Press. 1995.

HAJISHENGALLIS, G. *Porphyromonas gingivalis*-host interactions: open war or intelligent guerilla tactics. *Microbes Infect*. 2009; 11: 637–645.

HANDLER, N.H E SHEPRO, D. Cheek pouch technology: Uses and applications. In “The Golden Hamster – Its Biology and Use in Medical research”. (R.A. Hoffman, P.F. Robinson e H. Magalhas, eds) .1968. Iowa State Univ, Press.Ames 195-201.

HAUCK G, SCHRÖER H. Vital microscopy studies on the localization of protein permeability in the terminal stream bed of homoiotherms. *Pflugers Arch*.1969; 312(1):32-44

Hyman, M.C; Petrovic-Djergovic, D; Visovatti, S.H; Liao, H; Yanamadala, S. et al. Self-regulation of inflammatory cell trafficking in mice by the leukocyte surface apyrase CD39. *J Clin Invest*. 2009;119(5): 1136-1149.

HOCHMAN, B; FERREIRA, L.M; VILAS BÔAS, F.C; MARIANO, M. Modelo experimental no *hamster (Mesocricetus auratus)* para estudo de transplantes heterólogos de cicatrizes e doenças cutâneas em cirurgia plástica. *Acta Cir Bras* .2004;19. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>.

HOUSE, S.D; JOHNSON, P.C. Diameter and blood flow of skeletal muscle venules during local flow regulation. *Am J Physiol* 1986; 250: H828 – H837.

INCE, C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*. 2005; 9(4):S13-S19.

KENNE, E E LINDBOM, L. Imaging inflammatory plasma leakage in vivo. *Thromb Haemost*. 2011; 105(5):783-9.

KHAKH, B.S; NORTH, R.A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature*. 2006; 442:527–532.

KUBES, P; GRANGER, D.N. Leukocyte-endothelial cell interactions evoked by mast cells. *Cardiovasc Res*. 1996; 32: 699–708.

KUMAR, P; SHEN, Q; PIVETTI, C.D; LEE, E.S; WU, M.H; YUAN, S.Y . Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Rev Mol Med*. 2009; 30:11:e19.

LAMONT, R.J; JENKINSON, H.F. Subgingival colonization by *Porphyromonas ingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 2000; 15:341–349.

LEY, K. The microcirculation in inflammation. In: Handbook of Physiology: Microcirculation (Tuma RF, Duran WN, & Ley K, eds.). *Academic Press*. 2008; 9: 387–448.

LEVICK, J.R. An Introduction to Cardiovascular Physiology: The microcirculation and solute exchange. Fifth Edition. Great Britain. Hodder Arnold. 2010; 166-168.

MAJNO, G; PALADE, G.E. Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol*. 1961; 11:571-605.

MAJNO, G. Ultrastructure of the vascular membrane. In: *Handbook of Physiology, Circulation*, Vol. III, ed. Hamilton WF. Washington, DC: *American Physiological Society*. 1965; 64(2):2293 – 2375.

MARIATHASAN, S; MONACK, D.M. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7:31–40.

MARTINS-SILVA, J. Conceitos sobre hemorreologia e microcirculação humana. *Boletim da SPHM*. 2012; 27 (3).

MC MASTER, P.D AND PARSONS, R.J. Physiological conditions existing in connective tissue. I. The method of interstitial spread of vital dyes. *J Exp med*. 1939; 69:247.

MICHEL, C.C. Fluid exchange in the microcirculation. *J Physiol*. 2004;15 (3), 557:701-702.

MONTEIRO, A.C; SCOVINO, A; RAPOSO, S; GAZE, V.M; CRUZ, C. *et al*. Kinin danger signals proteolytically released by gingipain induce Fimbriae-specific IFN-gamma- and IL-17-producing T cells in mice infected intramucosally with *Porphyromonas gingivalis*. *J Immunol*. 2009; 183(6): 3700-3711.

NORTH, R.A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Ver*. 2002; 82:1013–1067

OLSON, Y; SVENSJÖ, E; ARFORS, K.E AND HULTSTRÖM, D. Fluorescein labelled dextrans as tracers for vascular permeability studies in the nervous system. *Acta Neuropath*. 1975; 33:45.

PICCINI, A; CARTA, S; TASSI, S; LASIGLIÉ, D; FOSSATI, G. *et al*. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105 (23):8067-8072.

PRIDDY, R.B; BRODIE, A.F. Facial Musculature, nerves and blood vessels of the hamster in relation to the cheek pouch. *J. Morphol.* 1948; 83:149- 180. In: Eugene RM and Miguel CC editors. *Handbook of Physiology Circulation. Am Physiol Soc.* 1984; 2 (4):11- 40.

RAO, K.N, BROWN, M.A. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Ann NY Acad Sci.* 2008; 1143:83–104.

RAUD, J e LINDBOM, L. Studies by intravital microscopy of basic inflammatory reactions and acute allergic inflammation. In: *The Handbook of Immunopharmacology. Academic Press, London.* 1994; 127-170.

RAUD, J; DAHLÉN, S.E; SMEDEGÅRD, G; HEDQVIST, P. An intravital microscopic model for mast cell-dependent inflammation in the hamster cheek pouch. *Acta Physiol Scand.* 1989; 135(2):95-105.

RITSMA, L; PONSIOEN, B; VAN RHEENEN, J. Intravital imaging of cell signaling in mice. *IntraVital.* 2012; 1:0–8.

RUTILI, G e ARFORS, K.E. Fluorescein-labelled dextran measurement in interstitial fluid in studies of macromolecular permeability. *Microvasc Res.* 1976; 12(2):221-230.

SAKAI, H; HARA, H; TSAI, A.G; TSUCHIDA, E; INTAGLIETTA, M. Constriction of resistance arteries determines I-NAME-induced hypertension in a conscious hamster model. *Microvasc Res.* 2000; 60: 21 – 27.

SAWANT, D.A; THARAKAN, B; WILSON, R.L; STAGG, H.W; HUNTER, F.A; CHILDS, E.W. Regulation of tumor necrosis factor- α -induced microvascular endothelial cell hyperpermeability by recombinant B-cell lymphoma-extra-large. *J Surg Res.* 201; 184:628-37.

SCHENKEIN, H.A. Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol.* 2006; 40: 77-93.

Schmitz, V; Svensjö, E; Serra, R.R; Teixeira, M.M; Scharfstein, J. Proteolytic generation of kinins in tissues infected by *Trypanosoma cruzi* depends on CXC chemokine secretion by macrophages activated via Toll-like 2 receptors. *J Leukoc Biol.* 2009; 85(6):1005-1014.

SCHWIEBERT, E.M; ZSEMBERY, A. Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1615:7–32.

SHAH, H. N AND COLLINS, M. D. Proposal for Reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a New Genus, *Porphyromonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1988;128-131.

SOCRANSKY, S.S; HAFFAJEE, A.D; CUGINI, M.A; SMITH, C. AND KENT, R.L. Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25: 134-144.

STAGG, H.W; BOWEN, K.A; SAWAN, T D.A; RODRIGUEZ, M; THARAKAN, B; CHILDS, E.W. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand promotes microvascular endothelial cell hyperpermeability through phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Am J Surg*. 2013; 205:419-25.

STELEKATI, E; ORINSKA, Z; BULFONE-PAUS, S. Mast cells in allergy: innate instructors of adaptive responses. *Immunobiology*. 2007; 212:505–519.

SUGIYAMA, K. Significance of ATP-splitting activity of rat peritoneal mast cells in the histamine release induced by exogenous ATP. *Jpn J Pharmacol*. 1971; 21(4):531-9.

SURPRENANT, A; RASSENDREN, F; KAWASHIMA, E; NORTH, R.A E BUELL, G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*. 1996. 272: 735-738.

SVENSJÖ, E; ARFORS, K.E; ARTURSON, G; RUTILI, G. The hamster cheek pouch preparation as a model for studies of macromolecular permeability of the microvasculature. *Uppsala J Med Sci* 1978; 83:71-79.

SVENSJÖ, E; ARFORS, K.E. Dimensions of postcapillary venules sensitive to bradykinin and histamine-induced leakage of macromolecules. *Ups J Med Sci*. 1979; 84(1):47-60.

SVENSJÖ, E; ARFORS, K.E; RAYMOND, R.M; GREGA, G.J. Morphological and physiological correlation of bradykinin-induced macromolecular efflux. *Am J Physiol*. 1979; 236(4):H600-666.

SVENSJÖ, E; ROEMPKE, K. Microvascular permeability effects of purine-related compounds in the hamster cheek pouch. In: *Anti-asthma xanthines and adenosine*. Editors: Anderson K-E; Persson C.G.A. Excerpta Medica, Amsterdam. 1985; 385-389.

SVENSJÖ, E; GREGA, G.J. Evidence for endothelial cell-mediated regulation of macromolecular permeability by postcapillary venules. *Fed Proc*. 1986; 45(2):89-95.

SVENSJÖ, E. The hamster cheek pouch as a model in microcirculation research. *Eur Respir J Suppl*. 1990; 12:595-601.

SVENSJÖ, E. The hamster cheek pouch as a research model in inflammation. Chapter 30 In: David Shepro (Editor). *Microvascular Research – Biology and Pathology*. Elsevier Academic Press. P. 2006; 195 – 207.

Svensjö E, Saraiva EM, Bozza MT, Oliveira SM, Lerner EA, Scharfstein J. Salivary gland homogenates of *Lutzomyia longipalpis* and its vasodilatory peptide maxadilan cause plasma leakage via PAC1 receptor activation. *J Vasc Res*. 2009; 46(5):435-46.

THARAKAN, B; HELLMAN, J; SAWANT, D.A; TINSLEY, J.H; PARRISH, A.R; HUNTER, F.A, *et al.* β -Catenin dynamics in the regulation of microvascular endothelial cell hyperpermeability. *Shock*. 2012; 37:306-11.

THORLACIUS, H; RAUD, J; XIE, X; HEDQVIST, P; LINDBOM, L. Microvascular mechanisms of histamine-induced potentiation of leukocyte adhesion evoked by chemoattractants. *Br J Pharmacol*. 1995; 116(8):3175-80.

TRZECIAK, S; CINEL, I; DELLINGER, R; SHAPIRO, N.I; ARNOLD, R.C; PARRILLO, J.E. *et al.* Resuscitating the Microcirculation in Sepsis: The Central Role of Nitric Oxide, Emerging Concepts for Novel Therapies, and Challenges for Clinical Trials. *Acad Emerg Med*. 2008; 15(5):399-413.

VINEGONI, C; LEE, S; FERUGLIO, P.F; WEISSLEDER, R. Advanced Motion Compensation Methods for Intravital Optical Microscopy. *IEEE J. Sel Top Quantum Electron*. 2014; 20(2).

WIEDEMAN, M.P. Patterns of the arteriovenous pathways. In: Hamilton WF. *Handbook of Physiology. Circulation*, Washington, DC: *Am. Physiol. Soc.* 1963; 2(II): 891- 933.

WIEDEMAN, M.P. ARCHITECTURE. In: *Handbook of Physiology. Section 2: The Cardiovascular System, Vol. IV, Microcirculation, Part 1* (Renkin EM & Michel CC, eds.). *American Physiological Society*, Bethesda, Md. 1984; 2: 11–40.

WEIGERT, R; SRAMKOVA, M; PARENTE, L; AMORNPHIMOLTHAM, P; ASEDUNSKAS, A. Intravital microscopy: a novel tool to study cell biology in living animals. *Histochem Cell Biol*. 2010; 133:481–91.

YOSHIMURA, F; MURAKAMI, Y; NISHIKAWA, K; HASEGAWA, Y; KAWAMINAMI, S. Surface components of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2008; 44:1–12.

ZAMBON, J.J. Microbiology of periodontal disease. In: Genco RJ, Goldman HM, Cohen DW, ed. *Contemporary periodontics*. St. Louis: CV Mosby, 1990;147–60.

