

Aguinaldo Cândido da Silva Facundo

**Análise hematológica por hemograma, creatinina,
triglicérides e colesterol em ratos diabéticos
portadores de infecção pulpar e/ou periodontal.**

ARAÇATUBA-SP

2013

Aguinaldo Cândido da Silva Facundo

**Análise hematológica por hemograma, creatinina,
triglicérides e colesterol em ratos diabéticos
portadores de infecção pulpar e/ou periodontal.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Araçatuba, como parte dos
requisitos para obtenção do título de MESTRE em
Ciência Odontológica – Área de Concentração:
Endodontia.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra

ARAÇATUBA-SP

2013

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F291a	Facundo, Aguinaldo Cândido da Silva. Análise hematológica por hemograma, creatinina, triglicérides e colesterol em ratos diabéticos portadores de infecção pulpar e/ou periodontal / Aguinaldo Cândido da Silva Facundo. - Araçatuba : [s.n.], 2013 80 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientador: Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra 1. Diabetes mellitus 2. Endodontia 3. Periodontia Black D24 CDD 617.69
-------	---

DADOS CURRICULARES

Aguinaldo Cândido da Silva Facundo

Nascimento	22 de Julho de 1986 São José do Rio Preto/SP
Filiação	Jailson Carlos Facundo Ângela Maria Cândida da Silva Facundo
2005 - 2008	Curso de graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
2011 - 2013	Curso de Pós-graduação em Ciência Odontológica – Área de concentração: Endodontia, nível de mestrado – Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Aos meus pais **Jailson e Angela**, pelo amor e ensinamentos de vida, os alicerces da minha formação pessoal.

À minha avó **Josefa**, por todo amor e apoio inestimável.

À minha tia **Isabel**, que nos deixou quando entrei no mestrado. Sempre me deu forças e ao lado do nosso pai maior estará compartilhando deste momento. Saudade eterna.

À minha namorada **Larissa**, pelo companheirismo, amor e principalmente paciência durante a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus

Por estar presente em minha vida, por ouvir minhas preces e sempre me reservar o que há de melhor.

Ao Professor Luciano Tavares Ângelo Cintra

Pela orientação, incentivo e amizade. Obrigado por compartilhar seu conhecimento, seu amor pelo ensino e pela pesquisa. Obrigado principalmente pelo exemplo de pessoa, caráter e dedicação. Levarei seus ensinamentos comigo para sempre.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho” – UNESP, nas pessoas dos professores **Dr^a. Ana Maria Pires Soubhia**, digníssima diretora e **Dr. Wilson Roberto Poi**, digníssimo vice–diretor.

Aos professores **Eloi Dezan Júnior, João Eduardo Gomes Filho, José Arlindo Otoboni Filho, Mauro Juvenal Nery e Roberto Holland**, pela amizade construída e pelo conhecimento compartilhado nesses anos de convivência.

Às professoras **Dóris Hissato Sumida e Suely Regina Mogami Bonfim**, pelo apoio e auxílio prestado neste trabalho.

A todos os docentes do programa de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP que lecionaram durante meu curso.

Aos técnicos do laboratório de endodontia, **Nelci e Cláudia**, pelo conhecimento e por todo auxílio prestado em nossos experimentos.

Aos funcionários da biblioteca pelo profissionalismo.

Aos amigos **Luis e Juscelene**, pós-graduandos da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, pela prontidão e apoio na realização deste trabalho.

Aos amigos de pós-graduação, **Gustavo, Carla, Simone, Paulo, Luciana, Ludmilla, Diego, Renata, India, Annelise, Mariane e Marcelo**, pela amizade, companheirismo e colaboração.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das infecções pulpar e/ou periodontal associadas com a diabetes na análise hematológica por hemograma, creatinina, triglicérides e colesterol. Foram utilizados 80 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) divididos em 8 grupos de 10 animais: G1 – ratos controle (normoglicêmicos); G2 – ratos com infecção pulpar; G3 – ratos com infecção periodontal; G4 – ratos com infecção pulpar e periodontal; G5 – ratos diabéticos; G6 – ratos diabéticos com infecção pulpar; G7 – ratos diabéticos com infecção periodontal; G8 – ratos diabéticos com infecção pulpar e periodontal. A diabetes foi induzida por meio de uma aplicação de estreptozotocina via veia peniana. A infecção pulpar foi induzida por meio da exposição pulpar do primeiro molar superior direito ao meio oral. A infecção periodontal foi induzida por meio da confecção de uma amarra junto ao colo dentário do segundo molar superior esquerdo. Após 30 dias, os animais foram sedados e por meio de uma punção cardíaca foi coletado 5ml de sangue para as análises de hemograma, creatinina, triglicérides e colesterol. Os resultados mostraram aumento no volume corpuscular médio das hemácias para ratos diabéticos, aumento na contagem de leucócitos, principalmente neutrófilos e linfócitos, aumento nos níveis séricos de creatinina e aumento nos níveis de triglicérides para os ratos diabéticos com as infecções orais induzidas. Fica demonstrado que a infecção pulpar e periodontal associadas são capazes de alterar os parâmetros sanguíneos de ratos diabéticos, como volume corpuscular médio, leucócitos, neutrófilos, linfócitos, creatinina e triglicérides.

Palavras-Chave:

Diabetes; infecção pulpar, infecção periodontal.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of pulpal and/or periodontal infections associated with diabetes in hematological analysis for blood count, creatinine, triglycerides and cholesterol. We used 80 male Wistar rats (*Rattus norvegicus* Albinus, Wistar) that were divided into 8 groups of 10 animals: G1 - control rats (normoglycemic); G2 – rats with pulpal disease, G3 - rats with periodontal disease; G4 – rats with pulpal and periodontal disease; G5 - diabetic rats; G6 - diabetic rats with pulpal disease; G7 - diabetic rats with periodontal disease; G8 - diabetic rats with pulpal and periodontal disease. Diabetes was induced by application of streptozotocin in penile vein. The pulpal infection was induced by dental pulp exposure of the upper right first molar to the oral environment. The periodontal infection was induced by a ligature around the neck of the upper left second molar. After 30 days, the animals were sedated and 5ml of blood was collected by cardiac puncture for blood count, creatinine, triglycerides and cholesterol analyzes. The results showed an increase in mean corpuscular volume of red blood cells in diabetic rats, increased leukocyte counts, especially neutrophils and lymphocytes, serum creatinine and triglyceride levels in diabetic rats with induced oral infections. It is demonstrated that the association of the pulpal and periodontal infections with diabetes can alter blood parameters of rats, as mean corpuscular volume, leukocytes, neutrophils, lymphocytes, creatinine and triglycerides.

Keywords:

Diabetes, pulpal infections, periodontal infections.

SUMÁRIO

Página

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE GRÁFICOS.....	iv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	v
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	7
3 - PROPOSIÇÃO.....	18
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	20
5 - RESULTADOS.....	30
6 - DISCUSSÃO.....	39
7 - CONCLUSÃO.....	46
8 - BIBLIOGRAFIA.....	48
ANEXOS.....	61

LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
FIGURA 1 - Injeção da droga streptozotocina na veia peniana do rato	22
FIGURA 2 - Aferição da glicemia com aparelho e fitas glicotestes (Accu-Check Performa - Roche-Diagnostics Corporation. Indianapolis, IN, USA)	22
FIGURA 3 - Exposição do primeiro molar superior direito com broca de aço carbono esférica com 0,1mm de diâmetro (Broca Ln Long Neck- Maillefer, Dentsply Ind. e Com. Ltda. Petrópolis, RJ, Brazil)	23
FIGURA 4 - Confecção de amarra com fio de algodão nº 24 (Coats Corrente Ltda. São Paulo, SP, Brasil) em torno do colo dentário do segundo molar superior esquerdo	24
FIGURA 5 - Indução da infecção pulpar no primeiro molar superior direito e indução da infecção periodontal ao redor do segundo molar superior esquerdo.	24
FIGURA 6 - Coleta sanguínea por punção cardíaca com agulha BD calibre 21G montada em seringa de 5 mL (BD - Becton, Dickinson and Company. São Paulo, SP, Brasil)	26
FIGURA 7 - Homogeneizador AP22 (Phoenix e Luferco equipamentos científicos Ltda. Araraquara, SP, Brasil) e analisador automático ABX (ABX Micros ABC Vet - Horiba ABX Diagnostics, Montpellier, France)	27
FIGURA 8 - Kits comerciais para dosagem de Creatinina, triglicérides e colesterol (Creatinina K Labtest® ref. 96, Triglicérides Liquiform Labtest® ref. 87 e Colesterol Liquiform Labtest® ref. 76, respectivamente - Labtest Diagnóstica Ind. e Com. Ltda, Lagoa Santa, MG, Brazil)	29

LISTA DE TABELAS

		<i>Página</i>
TABELA 1 -	Distribuição dos grupos experimentais de acordo com os procedimentos locais e condições sistêmicas dos animais	25
TABELA 2 -	Média e desvio padrão para os diferentes parâmetros do hemograma quanto à série vermelha	31
TABELA 3 -	Média e desvio padrão para os diferentes parâmetros do hemograma quanto à série branca	32
TABELA 4 -	Média e desvio padrão dos níveis séricos de creatinina (mg/dL)	35
TABELA 5 -	Média e desvio padrão dos níveis de colesterol e triglicérides (mg/dL)	37

LISTA DE GRÁFICOS

		<i>Página</i>
GRÁFICO 1 -	Projeção gráfica dos resultados para volume corpuscular médio (VCM)	33
GRÁFICO 2 -	Projeção gráfica dos resultados para leucócitos	33
GRÁFICO 3 -	Projeção gráfica dos resultados para leucócitos	34
GRÁFICO 4 -	Projeção gráfica dos resultados para linfócitos	35
GRÁFICO 5 -	Projeção gráfica dos resultados para dosagem de creatinina	36
GRÁFICO 6 -	Projeção gráfica dos resultados para dosagem de colesterol e triglicérides	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

dL - decilitros

μL - Microlitros

fL - Fentolitros

nm - Nanômetros

HDL - Lipoproteína de alta densidade

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

IL - Interleucinas

AGE - Produtos finais de glicosilação avançada

RAGE - Receptores dos produtos finais da glicosilação avançada

CEUA - Comitê de ética no uso de animais

VCM - Volume corpuscular médio

CHCM - Concentração de hemoglobina corpuscular média

VG - Volume Globular

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus é uma doença metabólica que ocorre devido a distúrbios na produção ou resistência à insulina, resultando no metabolismo anormal de gordura, açúcar e proteína que conduz ao estado hiperglicêmico (American Diabetes Association, 2010). Em 2011 havia cerca de 366 milhões de diabéticos no mundo todo e estima-se que esse número aumente para 552 milhões de diabéticos até 2030 (Whiting et al. 2011). O Brasil ocupa sexto lugar no ranking mundial com cerca de 5 milhões de diabéticos (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2011).

Diabetes mellitus é uma doença crônica com sérias consequências debilitantes ao longo de sua evolução e até o momento sem cura. Tradicionalmente, as complicações da diabetes têm sido atribuídas ao estado hiperglicêmico, que com o tempo, resultam na glicosilação da estrutura das proteínas e lipídeos, comprometendo a matriz extracelular e o tecido conjuntivo, bem como os tecidos vasculares. Estas mudanças estruturais resultam numa função capilar alterada e pobre perfusão sanguínea engatilhando um processo inflamatório sistêmico. Quando não controlada a diabetes pode contribuir para o aumento na suscetibilidade à infecção e inflamação como aquelas que ocorrem na doença periodontal ou endodôntica (Fouad, 2003, Deshpande et al., 2010; Lakschevitz et al., 2011; Preshaw et al., 2012).

Particularmente, a doença periodontal é uma das complicações mais prevalentes no paciente diabético (Awuti et al., 2012). Nestes pacientes o risco de desenvolvimento de doença periodontal é três vezes maior, sem relação com idade, sexo ou higiene oral (Emrich et al., 1991). Percebe-se também o aumento da severidade da doença periodontal crônica, de abscessos periodontais e da predisposição às infecções (Preshaw et al., 2011). A ativação da inflamação resulta na elevação da proteína C-reativa no desenvolvimento da fase aguda da periodontite (Tan et al. 2004). A via contrária, ou seja, o fato da infecção periodontal ser capaz de exacerbar a condição diabética, também é outra questão explorada (Lakschevitz et al., 2011). Estudos mostraram que pacientes diabéticos tem uma tendência à correlação com o grau de controle glicêmico, sugerindo que a doença periodontal pode contribuir para o desbalanceamento metabólico e resultar em intolerância á

insulina em pacientes diabéticos tipo 2 (King et al, 2003; Tan et al, 2004; Streja et al., 2003).

A infecção endodôntica, que também é muito prevalente na população em geral, é causada por fatores microbianos muito semelhantes àqueles observados nas doenças periodontais (Fouad, 2003). Entretanto, diferente das doenças periodontais, a relação da infecção endodôntica com a diabetes não tem sido explorada na mesma magnitude. Sabe-se que os pacientes diabéticos submetidos ao tratamento endodôntico têm maior perda dentária decorrente de insucesso, fato que indica a deficiente resposta do organismo frente às infecções (Fouad & Burleson 2003; Mindiola et al., 2006; López-López et al., 2011; Wang et al., 2011; Ng et al., 2011).

A literatura atual apresenta alguns artigos que mencionam as infecções endodônticas com um caráter mais agressivo e destrutivo em pacientes diabéticos. Experimentalmente percebeu-se que ratos diabéticos são mais significativamente afetados por problemas de origem endodôntica e apresentaram lesões periapicais maiores quando comparado a ratos normoglicêmicos. Acredita-se que as circunstâncias metabólicas produzidas pelo diabetes tipo 2 realça o desenvolvimento das lesões periapicais em ratos (Armada-Dias et al., 2006; Catanzaro et al., 2006; Iwama et al., 2006), no entanto, sua progressão e associação com outras condições, além do seu impacto na condição sistêmica, não têm sido muito estudada.

Diante desta provável influência que as inflamações locais podem ter na dosagem glicêmica, uma preocupação surge quanto ao perfil do processo inflamatório e infeccioso tanto de origem pulpar quanto periodontal. Neste sentido, sabe-se que a hiperglicemia correlaciona-se com a intensidade do processo inflamatório (Amir et al., 2011). Portanto é de fundamental importância estabelecer parâmetros para comparação entre a condição glicêmica do animal e o perfil da inflamação local.

O hemograma por ser um exame de sangue que permite a avaliação da série vermelha, série branca e plaquetas, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, pode facilitar o diagnóstico de doenças, resposta do indivíduo a infecção e até mesmo a progressão de um tratamento (Gkrania-Klotsas et al., 2010;

Odagiri et al., 2011). Os leucócitos participam na defesa contra os patógenos, sendo os neutrófilos as células mais abundantes, constituindo entre 50-70% dos leucócitos, e seu número aumentado é comumente observado nas infecções bacterianas, como as observadas nas lesões endodônticas e periodontais (Carneiro et al., 2012; Ma et al., 2011).

A análise por hemograma é comumente utilizada em modelo animal, particularmente no rato, por possibilitar a padronização dos espécimes e ser representativa para a correlação com estudos em humanos (Azeez et al., 2010; López et al., 2011).

Recentemente, análises por hemograma sanguíneo detectaram a presença de quadros de leucopenia ou trombocitose em ratos portadores de diabetes (Azeez et al., 2010; Saba et al., 2010). Também foi observada correlação positiva entre o volume médio de plaquetas e a microalbuminúria (Unübol et al., 2011) e entre o controle glicêmico e o aumento da atividade plaquetária em pacientes com diabetes (Demirtunc et al., 2009). Outro estudo tentou correlacionar a doença periodontal com alterações do conteúdo sanguíneo, e apesar de se observar diferença nos níveis de hemoglobina e na contagem de hemácias, apenas o número de leucócitos foi elevado de forma significativa no grupo com periodontite (Žilinskas et al., 2011ab). Alterações na quantidade de plaquetas e de eosinófilos também já foram observadas em pacientes com periodontite (López et al., 2011). Assim, faz-se necessário um estudo para averiguar se as infecções pulpar e/ou periodontal podem influenciar em alguns dos parâmetros observados no hemograma, e ainda, podendo ser moduladas pela presença da diabetes.

Outra complicação para os pacientes diabéticos é a disfunção renal (Baig et al., 2011). A diabetes mellitus é uma das principais causas do desenvolvimento da insuficiência renal crônica, observada em 29% do total de pacientes (Morsch et al., 2005). O excesso de glicose no sangue passa a ser eliminado na urina (glicosúria), juntamente com proteínas (proteinúria), sendo considerados indicadores para diabetes. Para eliminar o excesso de glicose também se elimina muita água, necessária para a diluição dessa glicose, ocasionando uma desidratação. Poliúria e polidipsia também são sinais típicos da diabetes, que sobrecarrega a função dos rins acarretando em disfunção renal (Tang et al., 2011).

A nefropatia diabética acomete cerca de 40% dos pacientes diabéticos e é a principal causa de insuficiência renal em pacientes que ingressam em programas de diálise (Gross & Nehme, 1999). A insuficiência renal, por sua vez, é considerada como causa terminal ou que contribui para a morte do indivíduo (Rezende et al., 2004). Além disso, a mortalidade dos pacientes diabéticos em programas de hemodiálise também é maior do que em não diabéticos (Gross & Nehme, 1999).

A função renal pode ser avaliada pelos níveis de creatinina no sangue. A Creatinina é resultante do metabolismo da creatina, encontrada nos músculos, cuja conversão ocorre 24 horas ao dia e é livremente filtrada. Seu nível é muito pouco afetado pela dieta habitual, sendo indicador da diminuição da função dos rins. O aumento do nível de creatinina se torna significativo quando existe uma perda de mais de 50% da função dos rins, já em baixa dosagem representa maior risco de desenvolvimento da diabetes (Marcotte & Godwin 2006; Harita et al., 2009; Ioannidou & Swede 2011).

A inter-relação entre a insuficiência renal crônica, a diabetes e as condições bucais já foi relatada (Akar et al., 2011). Pacientes com alterações na função renal mostraram ser duas vezes mais propensos a desenvolver doença periodontal, em comparação com pacientes com a função renal normal (Ioannidou et al., 2012). Sendo assim, faz-se necessário um estudo para avaliar se a infecção pulpar, assim como a infecção periodontal, também pode influenciar na função renal, principalmente quando associadas à diabetes.

Ainda com relação à nefropatia, em 90% dos pacientes com doença renal crônica foi evidenciado quadros hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (Sposito et al., 2007; Fentoğlu et al., 2011).

As dislipidemias são comumente encontradas em pacientes com doença renal crônica, mas não são normalmente caracterizadas por níveis elevados de colesterol total, exceto em pacientes com proteinúria elevada. Os níveis de triglicérides aumentados, em conjunto com diminuição dos níveis de HDL (lipoproteína de alta densidade) são as anormalidades mais comuns encontradas no indivíduo com doença renal (Keane et al., 2012).

Os triglicérides são a forma de armazenamento energético mais

importante no organismo, constituindo depósitos no tecido adiposo junto ao tecido muscular. As causas de elevação dos triglicérides são as várias doenças de lípidos chamadas hiperlipidemias ou hiperlipoproteínemias (Fentoğlu et al., 2011). As hiperlipidemias podem estar associadas a doenças cardiovasculares e crônicas, como por exemplo, a diabetes (Taleghani et al., 2010). As dislipidemias habitualmente encontradas em diabéticos são hipertrigliceridemia, redução do HDL (High-density lipoprotein) ou colesterol “bom” e aumento do volume de partículas de LDL (Low-density lipoprotein) ou colesterol “ruim” (Sposito et al., 2007).

O colesterol é precursor dos hormônios esteroides, dos ácidos biliares e da vitamina D. Além disso, como constituinte das membranas celulares, o colesterol atua na fluidez destas e na ativação de enzimas (Vieira et al., 2011). A hiperglicemia e hipercolesterolemia diabética constituem um processo responsável pela elevada morbidade e mortalidade de pacientes diabéticos (Davies et al., 2011), sendo a doença cardiovascular responsável por até 80% dessas mortes (Gus et al., 2004).

As infecções orais exercem certa influência sobre a diabetes e, esta, sobre a insuficiência renal (Akar et al., 2011; Rojo-Botello et al., 2011; Kodama et al., 2011). Assim, podemos considerar a hipótese de que as infecções orais também podem influenciar nos níveis de triglicérides e colesterol em indivíduos diabéticos.

Diante do exposto, nos propomos à realização de exames sanguíneos, como hemograma, dosagem de creatinina, triglicérides e colesterol, que são de fácil reprodução e aplicação clínica, para verificar alterações em diferentes componentes sanguíneos em função da presença das infecções pulpares e/ou periodontais em ratos normoglicêmicos e diabéticos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Diabetes Mellitus

A insulina é um hormônio peptídico secretado pelas células pancreáticas, necessário para o transporte transmembrana de glicose e aminoácidos, para a formação de glicogênio no fígado e músculos esqueléticos, e para promover a conversão da glicose em triglicerídios e a síntese de ácidos nucleicos e de proteínas. Pacientes que apresentam resistência à ação da insulina têm a utilização da glicose diminuída, o que facilita o desenvolvimento de hiperglicemias (Cotran et al., 2000).

Os efeitos tóxicos diretos da elevada glicose sanguínea podem ter importantes consequências patológicas. No entanto, evidências atuais sugerem que os efeitos indiretos da hiperglicemia, tais como a formação de produtos de finais de glicosilação avançada (AGE), estão implicados na indução de efeitos tóxicos. A interação entre os AGEs com seus receptores (RAGE) parece mediar a disfunção celular crônica. A resposta alterada do hospedeiro à infecção ocorre em indivíduos diabéticos e pode estar relacionada com o acúmulo de AGEs e sua interação com receptores RAGE nos tecidos. De forma geral, os AGEs se formam e acumulam nos tecidos em condições diferentes, incluindo o envelhecimento, insuficiência renal e diabetes. Em circunstâncias normais, os receptores RAGE estão presentes em baixos níveis em vários tipos de células, inclusive monócitos e células endoteliais. Em condições anormais, como na diabetes, a expressão dos receptores RAGE em células-alvo é significativamente aumentada. A acumulação dos AGEs nos tecidos e sua interação com receptores RAGE pode alterar significativamente a capacidade do tecido em responder à infecção. Estas alterações incluem o aumento da permeabilidade vascular e maior expressão de moléculas de adesão em células endoteliais; atração e ativação de macrófagos, levando à liberação de citocinas pró-inflamatória (Armada-Dias et al., 2006).

A American Diabetes Association classifica a diabetes mellitus em tipo 1, tipo 2, diabetes gestacional (GDM) e outros tipos específicos. Estima-se que 90% dos indivíduos diabéticos sejam do tipo 2 e 10% sejam do tipo 1. Diabetes gestacional e outros tipos específicos, como defeito genético das células β ou

doença do pâncreas exócrino, fazem parte de uma minoria dos casos.

A diabetes tipo 1 pode ser definida como uma doença autoimune que provoca destruição das células β -pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina. A falta de produção de insulina em pacientes com diabetes tipo 1 torna necessário o uso de insulina exógena, daí o nome insulino-dependente. Na ausência de insulina, esses indivíduos desenvolvem cetoacidose, uma condição com risco de morte.

Com relação à diabetes tipo 2, esta resulta da resistência das células alvo à insulina circulante. Os indivíduos com diabetes tipo 2 têm a produção de insulina alterada, no entanto, não ocorre destruição autoimune das células β -pancreáticas como na diabetes tipo 1, e os pacientes mantêm a capacidade para alguma produção de insulina, diminuindo o risco de cetoacidose. Com a progressão da doença, a produção de insulina no pâncreas pode diminuir e a secreção se tornar insuficiente para compensar a resistência insulínica dos tecidos (American Diabetes Association, 2010).

Fatores ambientais como obesidade, alimentação e sedentarismo, são os maiores responsáveis pelo desenvolvimento de diabetes tipo 2. Assim, o tratamento mais efetivo baseia-se no controle glicêmico, dieta equilibrada, atividades físicas e redução da massa corpórea (Virally et al., 2007).

O diagnóstico da diabetes mellitus é realizado por meio da avaliação glicêmica. Segundo a American Diabetes Association, para ser considerado diabético a glicemia ocasional, medida a qualquer hora do dia, deve ser igual ou superior a 200 mg/dL, ou quando em jejum de 8 horas esse valor for maior ou igual a 126 mg/dL. Além dos valores considerados, o indivíduo ainda deve apresentar a tríade de sintomas poliúria, polidipsia e polifagia (excesso de urina, sede e fome respectivamente), que são sintomas clássicos da diabetes. A perda de peso sem motivo aparente, alterações na visão, fadiga, cansaço, irritabilidade, náusea, boca seca e cetoacidose também são sintomas da diabetes mellitus, que sugerem a necessidade de realizar o teste glicêmico (Mealey & Ocampo, 2007).

Pelas características dos sintomas, pode-se inferir que a diabetes está relacionada com várias complicações sistêmicas, entre elas: nefropatia, neuropatia,

retinopatia, infarto agudo do miocárdio e outras doenças cardiovasculares, abortos, complicações fetais, nascimentos prematuros, infecções e descontrole da doença, sendo que há uma relação bidirecional entre a diabetes e a infecção, tanto a diabetes favorece a ocorrência de infecções, como estas dificultam o controle glicêmico. As infecções desencadeiam uma resposta glicoregulatória caracterizada pelo aumento na secreção de glucagon, catecolaminas (epinefrina e noraepinefrina), hormônios do crescimento e cortisol. Esses hormônios são antagonistas à atividade da insulina e, conseqüentemente, ativam a produção de glicose pelo fígado, diminuem a utilização periférica de glicose (nos músculos), ativam a lipólise, cetogênese e degradação de proteínas (nos músculos). Essas ações dão origem à hiperglicemia, a qual torna difícil o controle de infecções (Diaz-Romero et al., 2005).

De forma geral, as complicações da diabetes são atribuídas ao estado hiperglicêmico, que com o tempo, resultam na glicosilação da estrutura das proteínas e lipídeos que comprometem a matriz extracelular e o tecido conjuntivo, bem como os tecidos vasculares (Lakschevitz et al., 2011). Estas mudanças estruturais resultam numa função capilar alterada e pobre profusão sanguínea engatilhando um processo inflamatório sistêmico (Demirtunc et al., 2009; Somma et al., 2011).

As alterações no metabolismo dos lípidos causadas pela diabetes predis põem o indivíduo às alterações vasculares, como obliteração e entupimento dos vasos (Taleghani et al., 2010). Essas alterações por sua vez aumentam o risco para doenças renais, pois desregulam a pressão corporal e a concentração de sais no sangue (Sposito et al., 2007; Fentoğlu et al., 2011). A insuficiência renal ainda é agravada pela diabetes, que eleva o teor de glicose no sangue, forçando os rins a absorver mais água para tentar diluir e eliminar essa glicose (Gross & Nehme, 1999). Nesse sentido se torna conveniente traçar o perfil lipídico de indivíduos diabéticos, bem como avaliar a função renal para se estabelecer uma relação entre essas duas complicações de alta prevalência na diabetes.

2.2. As infecções orais e a diabetes

As manifestações orais das infecções ocorrem mais rapidamente e mais severamente no tipo 1 do que no tipo 2. A idade e duração da doença além do grau de controle metabólico podem influenciar esta situação. Algumas queixas são mais comuns em pacientes diabéticos como alterações no paladar e a chamada “boca seca” (xerostomia). As alterações gustativas tem sido atribuídas à alteração nos receptores de glicose ou às manifestações neuropáticas da diabetes. A xerostomia é decorrente do aumento das glândulas parótidas e da diminuição fluxo salivar ocasionando dificuldade em engolir alimentos secos (Bender & Bender, 2003). Esta diminuição do fluxo salivar influencia diretamente na microflora oral (Ficara et al., 1975; Thorstensson et al., 1979) que por sua vez, favorece a predisposição e o desenvolvimento da doença cárie, doença periodontal e periapical (Moore et al., 2001; Herring & Shah 2006; Mealey & Rose 2008; Siudikiene et al., 2008).

Estas alterações no periodonto tornam a diabetes um fator de risco para o desenvolvimento de gengivites e periodontites, sendo os cuidados com a dieta, exercícios físicos e cuidados com a saúde bucal os métodos mais eficazes para prevenção e controle da diabetes.

Um estudo foi realizado para avaliar o impacto da periodontite no desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2, durante um período prolongado de 13 semanas em modelo animal experimental. Os resultados indicaram que a periodontite acelerou o aparecimento de resistência à insulina em ratos obesos tratados com uma dieta rica em gordura. Assim, ficou demonstrado que a periodontite pode acelerar o aparecimento de resistência à insulina em ratos obesos que têm uma predisposição para desenvolver diabetes mellitus tipo 2 (Watanabe et al., 2008).

Essa relação entre a doença periodontal e a diabetes coloca a periodontite como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, com o mesmo potencial que outros fatores como fumo, diabetes, fatores comportamentais, idade e sexo (Sridhar et al., 2009). Há ainda um grande interesse nos efeitos sistêmicos dos níveis de citocinas pró-inflamatórias potencialmente elevadas pela periodontite. Esse aumento nos níveis de citocinas

pró-inflamatórias causa um aumento nos níveis de lipídeos séricos. Isto altera a função das células imunológicas, resultando em aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias pelos polimorfonucleares, diminuição da produção de fatores de crescimento a partir dos macrófagos teciduais reduzindo a capacidade de reparação e levando a um colapso tecidual, e um estado de hiper-resposta monocítica resultando em aumentos adicionais de citocinas pró-inflamatórias e lipídios. Assim, em indivíduos saudáveis, a potencial relação entre a hiper-resposta monocítica e doença sistêmica pode realmente começar com periodontite (Sridhar et al., 2009).

A doença periodontal foi associada com o aumento nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, bem como aumento nos níveis lipídicos, levando a quadros de hiperlipidemia (Fentoğlu et al., 2011).

A saúde bucal, mais precisamente a doença periodontal, são fatores agravantes para o desenvolvimento de doença renal crônica. As desordens renais são complicações da diabetes, e podem ser agravadas pelo quadro infeccioso e inflamatório da doença periodontal, que resulta em uma inflamação de ordem sistêmica (Akar et al., 2011).

A susceptibilidade à doença periodontal é aproximadamente três vezes maior em pacientes diabéticos, havendo uma clara relação entre a hiperglicemia e a severidade da doença periodontal. As alterações metabólicas da diabetes, como a predisposição às infecções e alterações micro e macrovasculares, contribuem para o desenvolvimento da doença periodontal, bem como, as doenças periodontais por sua vez, levam a um quadro de inflamação de ordem sistêmica e aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, que interferem no controle glicêmico. Quando é realizada a terapia periodontal em pacientes diabéticos, estes apresentam melhoras no controle glicêmico, tornando-se o tratamento periodontal clinicamente relevante no controle da diabetes (Preshaw et al., 2011).

Assim como a doença periodontal, as infecções periapicais merecem certa atenção. Análises por meio de radiografias periapicais mostraram que as lesões endodônticas no paciente diabético possuem um caráter mais agressivo, e o sucesso do tratamento endodôntico está diretamente relacionado com o controle da glicemia (Bender & Bender, 2003).

A terapia endodôntica é realizada com o intuito de prevenir ou tratar as lesões perirradiculares. O tratamento preventivo é caracterizado pela excisão da polpa vital por motivos protéticos, restauradores ou quando esta apresenta quadro inflamatório irreversível. Durante o tratamento de lesões perirradiculares pré-existentes o objetivo é reduzir significativamente os microrganismos irritantes presentes no sistema de canais radiculares. Em ambos os casos o sucesso do tratamento é dado pela ausência de sinais e sintomas, bem como pelo reparo das lesões pré-existentes. Os pacientes diabéticos apresentam doença periapical mais severa em dentes envolvidos endodonticamente, sendo que a diabetes aumenta a ocorrência de “flare-ups” durante o tratamento. O sucesso do tratamento está intimamente relacionado com o controle da diabetes (Fouad et al., 2003).

Com o intuito de avaliar a relação entre diabetes e o desenvolvimento de lesões perirradiculares, foram utilizados ratos diabéticos e não diabéticos com exposição pulpar dos primeiros molares inferiores. Radiograficamente as lesões periapicais de ratos diabéticos eram maiores que em ratos normais. O exame histológico de espécimes representativos revelou lesões perirradiculares mais extensas e com exsudato inflamatório severo no grupo de ratos diabéticos quando comparado com o grupo controle (Armada-Dias et al., 2006). A explicação mais provável é de que há um potencial aumento da prevalência de alguns patógenos endodônticos virulentos em canais radiculares de pacientes diabéticos, tornando as lesões mais acentuadas que em pacientes não diabéticos.

Os mecanismos envolvidos na agressividade das lesões periodontais e periapicais em indivíduos diabéticos são muitos semelhantes. De certa forma devido ao próprio perfil da doença.

Recentemente foi demonstrado que a infecção endodôntica também é um fator de risco para doenças cardiovasculares e outras doenças sistêmicas comumente associadas com a periodontite (Cotti et al., 2011; Wang et al., 2011).

2.3. Relação da diabetes com as alterações hematológicas

O sangue é o meio através do qual o organismo transporta as substâncias e os elementos necessários à vida, é um tecido de cor vermelha e consistência líquida, é formado por plasma e três tipos de células: os glóbulos brancos (leucócitos), os vermelhos (hemácias ou eritrócitos), e plaquetas. O seu exame é a maneira mais fácil de obter informações valiosas sobre a saúde do paciente. É um exame que se constitui do hemograma, ou grupo de exames da série vermelha, do leucograma, que são os exames da série branca, e do plaquetograma. A interpretação do hemograma deve ser feita em três etapas. Primeiro a análise da série vermelha, depois a branca e por fim as plaquetas (Hoffman et al., 2012).

Durante as últimas décadas houve uma grande evolução tecnológica na realização do hemograma, com as técnicas manuais sendo substituídas por sistemas automatizados que apresentam maior precisão nos resultados e em um menor intervalo de tempo (Grotto, 2009; Sandhaus & Meyer, 2002).

O hemograma da série vermelha fornece os seguintes parâmetros: contagem de hemácias, volume globular, hemoglobina, volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média. Os parâmetros para a série branca consistem na contagem dos leucócitos e seus tipos celulares: leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Para as plaquetas as análises contabilizam o número de plaquetas e o volume plaquetário (Hoffman et al., 2012).

As alterações nas hemácias podem ser quanto ao número, sendo a eritropenia quando seu número está reduzido ou eritrocitose quando seu número está aumentado. Quanto ao volume elas podem ser microcíticas, normocíticas ou macrocíticas. As alterações nas hemácias estão principalmente relacionadas com os vários tipos das anemias existentes (Agarwal, et al., 2009; Dallak, 2009).

A hemoglobina é o principal constituinte das hemácias e responsável pelo transporte de oxigênio. Sua variação de volume ou concentração é o método mais utilizado para avaliar o tipo de anemia existente (Pradeep et al., 2011; Agarwal, et al., 2009).

Vários são os fatores que levam o indivíduo a um quadro anêmico, entre eles destacamos a periodontite crônica, onde sua progressão leva a uma diminuição na contagem de hemácias (Yamamoto et al., 2011; Hutter et al., 2001). A doença periodontal foi apontada como um fator predisponente à anemia crônica, bem como a terapia periodontal demonstrou ser efetiva no controle da anemia (López et al., 2011; Pradeep et al., 2011; Agarwal, et al., 2009)

Nesse sentido fica implícito que a doença periodontal é capaz de alterar os parâmetros hematológicos da série vermelha, como as hemácias ou a hemoglobina.

Quanto à série branca do hemograma, esta quantifica os leucócitos e seus tipos celulares. Os leucócitos fazem parte do sistema imune, são um grupo de células diferenciadas e participam na defesa contra os patógenos e na vigilância e remoção dos antígenos não próprios, podendo estar presente ou alterado quando da presença de infecções locais (Gkrania-Klotsas et al., 2010).

Os leucócitos apresentam-se em uma grande variedade de formas, tamanhos, número, e funções específicas, sendo eles: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos (López et al., 2012).

Dentre os tipos celulares, os neutrófilos são os mais abundantes, seguidos dos linfócitos, constituindo cerca de 60% e 30% dos leucócitos respectivamente, ambos com a função de combater as infecções, principalmente as de origem bacteriana. Os monócitos, eosinófilos e basófilos, menos abundantes constituindo 4%, 2% e 1% respectivamente, estão associados com presença de parasitoses e alergias (Theml, et al., 2004).

Quando da presença de infecção periodontal, é comum observar alterações no número de leucócitos. Estes estão aumentados para combater a infecção, e quando é estabelecida uma terapia para controle e tratamento da infecção local, os números de leucócitos tendem a se normalizar (Pussinen et al., 2011; López et al., 2011). Quando da presença de diabetes os leucócitos também podem estar alterados (Ekmekcioglu et al., 2001)

Da mesma forma que a doença periodontal influencia nos parâmetros

hematológicos, tanto da série vermelha, quanto da série branca, a doença pulpar também pode alterar tais parâmetros. Principalmente quando estas estiverem associadas à diabetes, que potencializa o efeito das infecções.

No estado hiperglicêmico, o excesso de glicose passa a ser eliminado na urina, para tanto há uma sobrecarga da função renal que precisa eliminar mais água para diluir a glicose. Juntamente com a glicose, os rins passam a eliminar proteínas e se não houver um controle glicêmico sua função fica comprometida. A poliúria e a proteinúria são sintomas típicos da diabetes, bem como a polidipsia causada pela desidratação (Tang et al., 2011)

Assim, uma das principais complicações crônicas da diabetes mellitus é insuficiência renal, também chamada de nefropatia diabética, responsável pelo aumento do número de pacientes em diálise em países em desenvolvimento, e já é a principal causa de terapia de substituição renal nos países desenvolvidos (Murussi et al., 2003).

A avaliação da função renal é feita através da taxa de filtração glomerular pela dosagem de albumina, cistatina C ou creatinina (Dalton, 2010; Batista et al., 2005; Murussi et al., 2003). A dosagem de creatinina no sangue é comumente utilizada, pois esta é um biomarcador sensível para a taxa de filtração glomerular (Dalton, 2010). A Creatinina é resultante do metabolismo da creatina, encontrada nos músculos, cuja conversão ocorre 24 horas ao dia e é livremente filtrada. Seu nível é muito pouco afetado pela dieta habitual, sendo indicador da diminuição da função dos rins; por isso, são utilizados como marcadores da função renal. O aumento do nível de creatinina se torna significativo quando existe uma perda de mais de 50% da função dos rins, já em baixa dosagem representa maior risco de desenvolvimento da diabetes (Marcotte & Godwin 2006; Harita et al., 2009; Ioannidou & Swede 2011).

A insuficiência renal como consequência da diabetes é um fato extensivamente explorado, sendo até mesmo considerada uma ocorrência comum no indivíduo hiperglicêmico. No entanto, algumas pesquisas vêm apontando alguma relação entre alterações nos níveis de creatinina e a presença de infecções bucais, uma vez que a diabetes é fator de risco para doença periodontal e devido à alta

prevalência de insuficiência renal nesses indivíduos, sugere-se que pacientes com insuficiência renal também possa apresentar alterações no periodonto (Messier et al., 2011).

A doença renal crônica provoca ainda alterações no perfil lipídico, sendo a hipertrigliceridemia a alteração mais comum, acompanhada da redução do HDL (Keane et al., 2012). A hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia aparecem em 90% dos pacientes com doença renal crônica, indicando forte relação entre estas alterações sistêmicas (Sposito et al., 2007; Fentoğlu et al., 2011).

As alterações lipídicas estão presentes no paciente diabético devido ao próprio perfil da doença, e são fatores de risco para eventos ateroscleróticos e alterações micro e macrovasculares (Lakschevitz et al., 2011; Santos et al., 2009).

Algumas pesquisas apontam que certas alterações nestes níveis podem apresentar ligações com a presença de infecções orais (López et al., 2011; Fentoğlu et al., 2011; Cotti et al., 2011), sendo a doença periodontal apontada como fator de risco para doenças cardiovasculares e eventos ateroscleróticos (López et al., 2011). A hiperlipidemia está associada com a doença periodontal pela liberação de citocinas pró-inflamatórias que prejudicam o metabolismo dos lipídeos (Fentoğlu et al., 2011).

Da mesma forma que a doença periodontal, as infecções endodônticas também foram associadas com detecção de lesões no sistema cardiovascular (Cotti et al., 2011; Wang et al., 2011). Se as lesões vasculares causadas pela infecção endodôntica são devido às alterações no metabolismo dos lipídeos, esta ainda é uma questão que precisa ser estudada.

Fica evidente que a diabetes mellitus é uma doença metabólica que provoca alterações no hemograma devido ao estado inflamatório sistêmico, provoca alterações no metabolismo dos lipídeos, pode levar à insuficiência renal crônica e é agravada pelas infecções locais, como as periodontais e periapicais, sendo que é possível estabelecer uma relação entre essas complicações e até mesmo diretrizes para o controle da doença, como cuidar da saúde bucal, dieta e exercícios.

3. PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

A revisão de literatura demonstrou ser oportuno verificar a influência das infecções pulpar e periodontal por meio da análise hematológica por hemograma, creatinina, triglicérides e colesterol de ratos diabéticos e não diabéticos.

Desta forma nos propusemos a:

- ✓ Identificar, por meio do hemograma sanguíneo, quais parâmetros celulares podem ser influenciados pela presença da infecção pulpar isolada ou associada à doença periodontal e em função da presença ou não da diabetes;
- ✓ Avaliar a função renal de animais com doença pulpar isolada ou associada à doença periodontal e em função da presença ou não da diabetes, por meio da verificação dos níveis de creatinina sérica;
- ✓ Verificar a influência da doença pulpar isolada ou associada à doença periodontal e em função da presença ou não da diabetes na dosagem de triglicérides e colesterol.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Animais

Foram utilizados 80 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 350g, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas, quatro ratos por gaiola, alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água “ad libitum”. Os procedimentos experimentais propostos neste estudo foram aprovados pelo comitê de conduta ética no uso de animais (CEUA – Unesp - 00539-2012).

4.1.2. Drogas empregadas

Para anestesia foi utilizado via intramuscular uma associação de um sedativo à base de xilazina a 2% (Rompum- Bayer S. A., São Paulo, SP, Brasil) na dosagem de 10mg por kilograma de peso corporal e um anestésico à base de Cloridrato de Ketamina a 10% (Francotar- Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda, Roseira, SP, Brasil) na dosagem de 80mg por Kilograma de peso corporal.

Para a indução da diabetes foi utilizado via veia peniana uma dose de 60mg/kg de estreptozotocina (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), dissolvida em tampão citrato (0.01M; pH 4,5) (Garber et al., 2009).

4.2. Métodos

4.2.1. Indução da diabetes

Os 80 animais foram anestesiados e divididos em dois lotes, onde 40 ratos receberam a dose de 60mg/kg de estreptozotocina dissolvida em tampão citrato (0.01M; pH 4,5), via endovenosa (veia peniana) (Figura 1) e receberam água

com açúcar nas primeiras 24 horas para evitar o choque hipoglicêmico. Os outros 40 ratos receberam também por via endovenosa solução salina, com o intuito de promover um efeito placebo nesses animais. No sexto dia do experimento, foi realizada a dosagem de glicose sanguínea para confirmação da hiperglicemia. Foram selecionados os ratos que obtiveram resultados acima de 250 mg/dL e, este dia, foi considerado o primeiro dia da doença diabetes (figura 2). Outros animais foram adicionados ao estudo até o total de 40 ratos diabéticos.



Figura 1 – Injeção da droga streptozotocina na veia peniana do rato.



Figura 2 – Aferição da glicemia com aparelho e fitas glicotestes (Accu-Check Performa - Roche-Diagnostics Corporation. Indianapolis, IN, USA).

4.2.2. Indução da infecção pulpar

Após a confirmação da diabetes 10 ratos normoglicêmicos e 10 ratos diabéticos foram novamente anestesiados. Após anestesia, foram expostas as polpas dos primeiros molares superiores direitos de cada animal, empregando-se uma broca em aço carbono esférica (Broca Ln Long Neck- Maillefer, Dentsply Ind. e

Com. Ltda. Petrópolis, RJ, Brazil) com 0,1mm de diâmetro (Garber et al., 2009) (Figura 3). Desta forma, todas as exposições pulpares foram padronizadas em diâmetro. A profundidade foi limitada pela espessura do teto da câmara pulpar, até o rompimento do mesmo (sensação de caída).



Figura 3 – Exposição do primeiro molar superior direito com broca de aço carbono esférica com 0,1mm de diâmetro (Broca Ln Long Neck- Maillefer, Dentsply Ind. e Com. Ltda. Petrópolis, RJ, Brazil).

4.2.3. Indução da infecção periodontal

Para o desenvolvimento da infecção periodontal, 10 animais normoglicêmicos e 10 animais diabéticos foram anestesiados com o mesmo protocolo anestésico descrito anteriormente. Após anestesia foi realizada uma amarra em torno do colo dentário do segundo molar superior esquerdo de cada animal. A indução por amarra foi realizada com a colocação de um fio de algodão numero 24 (Coats Corrente Ltda. São Paulo, SP, Brasil), ao redor do segundo molar superior (Holzhausen et al., 2002), cujo posicionamento correto das amarras foi feito com o auxílio de uma pinça modificada e de uma espaçador digital #25 empregado para o afastamento dos dentes, facilitando a passagem do fio (Figura 4). As amarras permaneceram por todo o período pós-operatório.

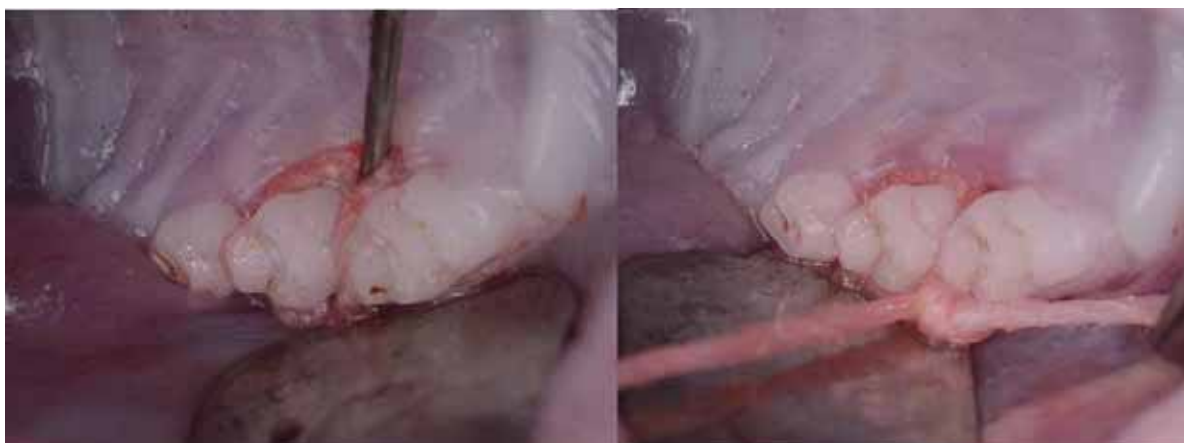


Figura 4 – Confeção de amarria com fio de algodão nº 24 (Coats Corrente Ltda. São Paulo, SP, Brasil) em torno do colo dentário do segundo molar superior esquerdo.

4.2.4. Indução da infecção pulpar e periodontal

Para o desenvolvimento de ambas as infecções foram anestesiados 10 ratos normoglicêmicos e 10 ratos diabéticos. A infecção pulpar foi realizada pelo mesmo método descrito anteriormente no primeiro molar superior direito, enquanto que a infecção periodontal foi realizada ao redor do segundo molar superior esquerdo de cada animal.

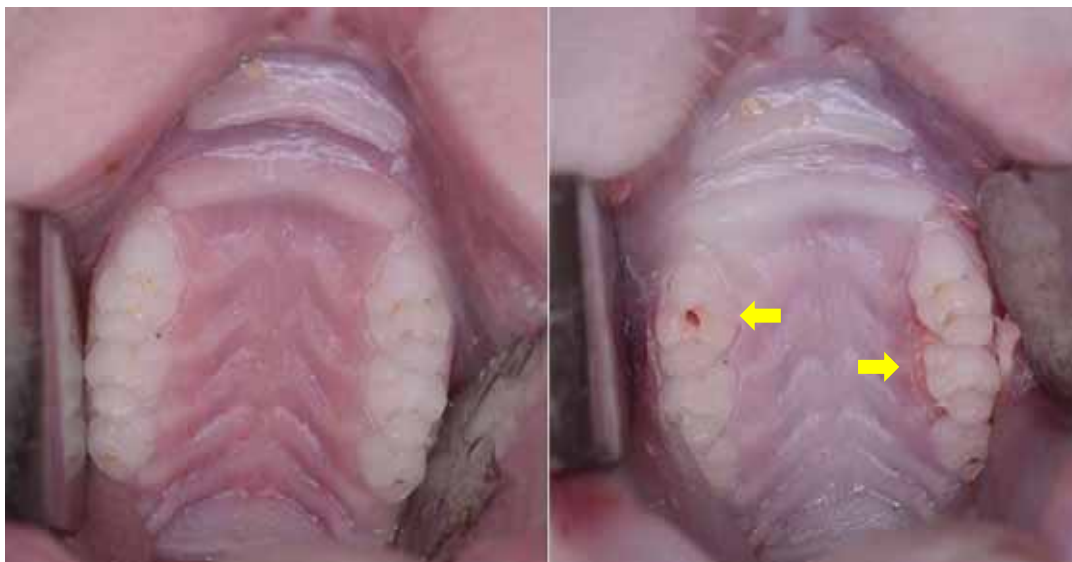


Figura 5 – Indução da infecção pulpar no primeiro molar superior direito e indução da infecção periodontal ao redor do segundo molar superior esquerdo.

4.2.5. Divisão em grupos

Os grupos foram formados de acordo com as condições sistêmicas e procedimentos locais de indução das infecções pulpar e periodontal e podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais de acordo com os procedimentos locais e condições sistêmicas dos animais.

		Infecções orais			
		Nenhuma	Pulpar	Periodontal	Ambas
Condição sistêmica	Normoglicêmicos	G1	G2	G3	G4
	Diabéticos	G5	G6	G7	G8

Os 80 ratos em estudo foram divididos em 8 grupos experimentais, contendo 10 animais cada:

- **Grupo 1:** ratos normoglicêmicos e sem quaisquer alterações pulpares ou periodontais;
- **Grupo 2:** ratos normoglicêmicos e portadores de infecção pulpar induzida;
- **Grupo 3:** ratos normoglicêmicos e portadores de infecção periodontal induzida;
- **Grupo 4:** ratos normoglicêmicos e portadores das infecções pulpar e periodontal induzidas;
- **Grupo 5:** ratos diabéticos e sem quaisquer alterações pulpares ou periodontais;
- **Grupo 6:** ratos diabéticos e portadores de infecção pulpar induzida;
- **Grupo 7:** ratos diabéticos portadores de infecção periodontal induzida;
- **Grupo 8:** ratos diabéticos portadores de infecções pulpar e periodontal induzidas.

As infecções pulpares e/ou periodontais foram realizadas no sexto dia seguinte à injeção de estreptozotocina, utilizada para o desenvolvimento da diabetes.

4.3. Sacrifício dos animais e coleta do material

Aos 30 dias após a indução das infecções, os animais foram anestesiados conforme protocolo descrito anteriormente e foi coletado a quantidade de 5 ml de sangue de cada animal por meio de punção cardíaca e o material foi reservado para as análises de hemograma, dosagem de creatinina, dosagem de triglicerídeos e dosagem de colesterol (figura 5). Após a coleta sanguínea, a eutanásia foi realizada com uma dose anestésica 10 vezes maior que a utilizada para anestesia.

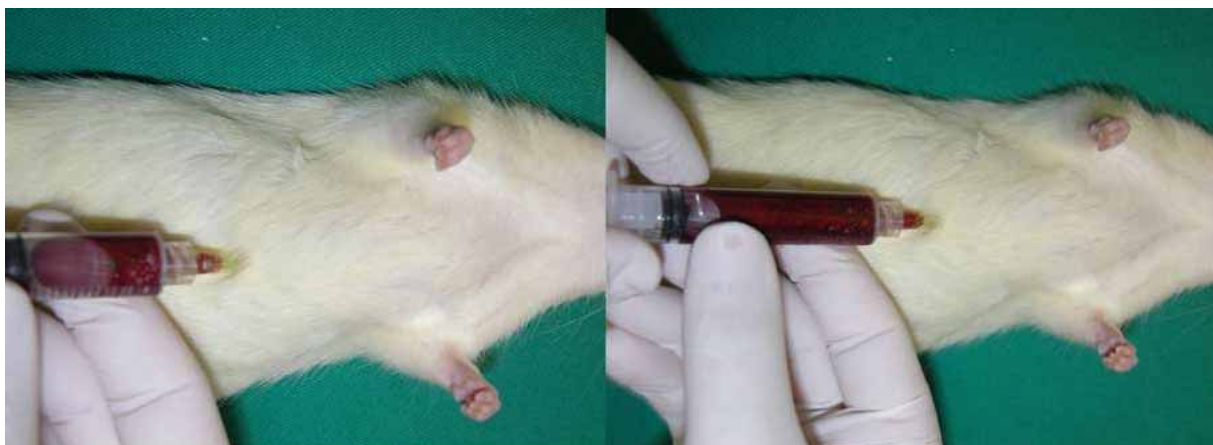


Figura 6 – Coleta sanguínea por punção cardíaca com agulha BD calibre 21G montada em seringa de 5 mL (BD - Becton, Dickinson and Company. São Paulo, SP, Brasil).

4.3.1. Análise por hemograma

As amostras para o hemograma foram colocadas em tubos contendo EDTA, homogeneizadas e armazenadas em recipiente térmico contendo gelo triturado até o momento da análise. Foram observados em hemograma os seguintes parâmetros: Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$), Volume Globular (%), Hemoglobina (g/dL), VCM (fL), CHCM (%), Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$), Neutrófilos (%), Linfócito (%), Monócito (%), Eosinófilo (%) e Basófilo (%).

Para a realização do hemograma, foi utilizado o homogeneizador AP 22 (Phoenix e Luferco equipamentos científicos Ltda. Araraquara, SP, Brasil), o analisador automático ABX (ABX Micros ABC Vet - Horiba ABX Diagnostics, Montpellier, France) (figura 7) e o kit ABX VetPack composto por 3 reagentes.



Figura 7 – Homogeneizador AP22 (Phoenix e Luferco equipamentos científicos Ltda. Araraquara, SP, Brasil) e analisador automático ABX (ABX Micros ABC Vet - Horiba ABX Diagnostics, Montpellier, France).

O analisador automático ABX possui uma cânula para aspirar uma quantidade de 20 μ L de sangue diretamente do tudo e fornece os resultados em aproximadamente 2 minutos. O processamento da amostra é feito por meio dos seus 3 reagentes, cada um com uma função específica.

O ABX VET Pack R3 é uma solução salina e tampão eletrolítico que permite a diluição e a preparação da amostra de sangue para análise. A presença de surfactante não iônico garante uma ótima dinâmica do fluxo em todos os sistemas hidráulicos do aparelho. A ação eletrolítica aceita a contagem das células por impedância. Este reagente diferencia populações morfológicas de leucócitos e é utilizado nos ciclos de enxágue e limpeza dos sistemas hidráulicos do instrumento.

O ABX VET Pack R2 decompõe a membrana celular das hemácias. Pela adição do agente surfactante, a hemoglobina é libertada. Todo o ferro heme é oxidado e os complexos resultantes são quantificados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 530 nm. O detergente presente na solução também diferencia populações morfológicas de leucócitos.

ABX VET Pack R1 utiliza a ação combinada de uma enzima proteolítica com um detergente para eliminar os resíduos de proteína e evitar que os tubos hidráulicos fiquem obstruídos e/ou bloqueiem o fluxo. Também é usado para decompor os acúmulos de proteína nas aberturas e câmaras de contagem.

Por se tratarem de valores absolutos, foi realizada a análise da variância

(ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparação entre as médias com nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

4.3.2. Dosagem de Creatinina

As amostras para a dosagem de creatinina foram acondicionadas em tubos sem anticoagulante e centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm para obtenção do soro. Para a determinação sérica foi utilizado o método de Jaffé modificado, onde a creatinina reage com o picrato alcalino formando um complexo de cor vermelha. Mede-se a velocidade de formação desse complexo em períodos iniciais curtos, evitando-se assim a interferência de outros compostos. A quantidade da cor formada é proporcional à concentração de creatinina na amostra. De acordo com o kit de Creatinina K Labtest (Labtest Diagnóstica Ind. e Com. Ltda, Lagoa Santa, MG, Brazil) (figura 7). Os valores aferidos por meio dos kits foram tabulados de acordo com cada grupo experimental e submetidos à análise estatística por meio da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, em nível de significância de 5% ($p < 0.05$), para comparação entre as médias.

4.3.3. Dosagem de triglicerídeos e colesterol:

As amostras para a dosagem de triglicérides e colesterol foram acondicionadas em tubos sem anticoagulante e centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm para obtenção do soro. Para a avaliação da dosagem de triglicérides e colesterol foi utilizado o método Enzimático-Colorimétrico (Trinder).

Para a determinação dos níveis de triglicérides foi empregado o kit de Triglicérides Liquiform Labtest (Labtest Diagnóstica Ind. e Com. Ltda, Lagoa Santa, MG, Brazil) (Figura 7). A lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triglicérides liberando glicerol, que é convertido, pela ação da glicerolquinase, em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina que tem máximo de absorbância em 540 nm. A

intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos triglicérides na amostra.

Para a dosagem de colesterol foi empregado o kit de Colesterol Liquiform Labtest (Labtest Diagnóstica Ind. e Com. Ltda, Lagoa Santa, MG, Brazil) (Figura 7). Os ésteres do colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase (CHE) formando colesterol livre que após oxidação pela colesterol oxidase (CHOD) forma peróxido de hidrogênio. Este, reagindo com o fenol e 4-aminoantipirina, através de copulação oxidativa catalisada pela peroxidase (POD), produz uma quinonimina de cor vermelha. A absorbância do complexo formado, medida em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra.

Os valores totais aferidos foram tabulados de acordo com cada grupo experimental e submetidos à análise estatística por meio da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, em nível de significância de 5% ($p < 0.05$), para comparação entre as médias.



Figura 8 - Kits comerciais para dosagem de Creatinina, triglicérides e colesterol (Creatinina K Labtest® ref. 96, Triglicérides Liquiform Labtest® ref. 87 e Colesterol Liquiform Labtest® ref. 76, respectivamente - Labtest Diagnóstica Ind. e Com. Ltda, Lagoa Santa, MG, Brazil).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Hemograma

O hemograma foi realizado aos 30 dias pós-operatórios e os seguintes parâmetros foram analisados: Hemácia, Volume Globular (VG), Hemoglobina, Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Leucócitos, Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos e Eosinófilos.

Para interpretação dos dados, o hemograma foi dividido em série vermelha, onde constam as hemácias e seus componentes, e série branca, onde constam os leucócitos e seus constituintes. Os valores obtidos e os resultados gerais dos testes estatísticos estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Média e desvio padrão para os diferentes parâmetros do hemograma quanto à serie vermelha.

Hemograma – Série vermelha					
Grupos	Hemácia($10^6/\mu\text{L}$)	VG(%)	Hemoglobina(g/dL)	VCM(fL)	CHCM(%)
	Média±DP*	Média±DP*	Média±DP*	Média±DP*	Média±DP*
G1	6,97±0,82 ^a	40,80±2,77 ^a	14,94±1,03 ^a	55,46±0,72 ^a	36,62±0,82 ^a
G2	7,28±0,54 ^a	42,00±1,58 ^a	15,40±0,54 ^a	55,34±0,79 ^a	36,67±0,70 ^a
G3	7,28±0,52 ^a	42,00±0,63 ^a	15,23±0,45 ^a	56,71±2,38 ^a	36,27±1,18 ^a
G4	7,38±0,42 ^a	42,00±2,58 ^a	15,44±0,48 ^a	57,17±1,52 ^{ab}	36,86±2,23 ^a
G5	7,36±0,34 ^a	43,42±1,98 ^a	15,11±1,20 ^a	60,51±1,61 ^{bc}	34,76±1,54 ^a
G6	7,41±0,38 ^a	43,71±1,70 ^a	15,62±1,00 ^a	60,52±3,44 ^c	35,72±2,24 ^a
G7	7,44±0,47 ^a	43,85±2,60 ^a	15,21±0,92 ^a	61,07±1,76 ^c	34,69±0,90 ^a
G8	7,52±0,55 ^a	44,66±2,87 ^a	15,73±1,02 ^a	61,46±0,53 ^c	35,34±3,34 ^a

*Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos

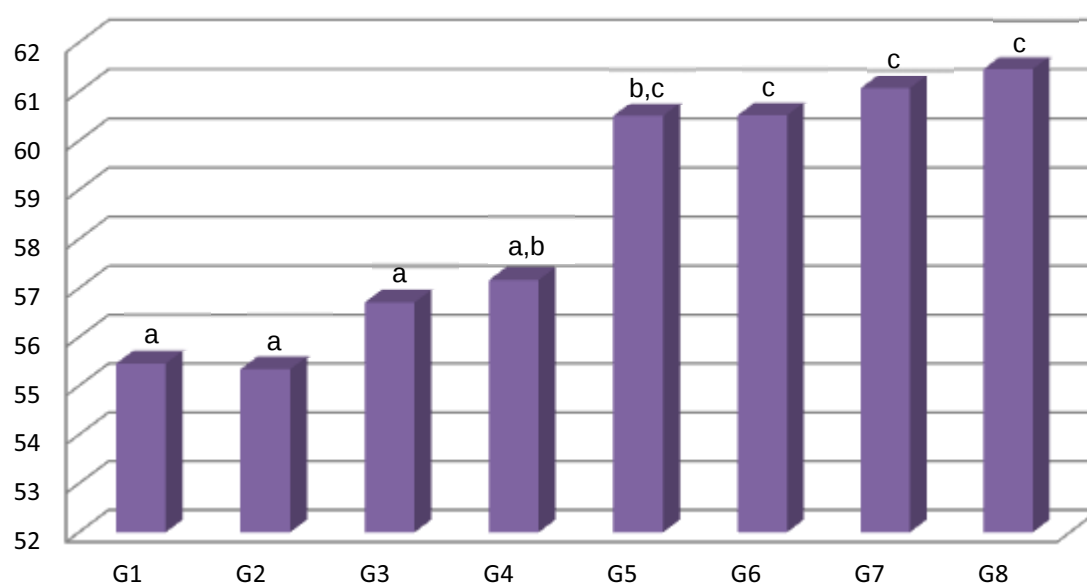
Tabela 3 - Média e desvio padrão para os diferentes parâmetros do hemograma quanto à série branca.

Hemograma – Série Branca					
Grupos	Leucócitos($10^3/\mu\text{L}$)	Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos
	Média $\pm$ DP*	Média $\pm$ DP*	Média $\pm$ DP*	Média $\pm$ DP*	Média $\pm$ DP*
G1	4,22 $\pm$ 0,90 ^a	28,00 $\pm$ 4,52 ^a	57,20 $\pm$ 2,77 ^a	2,80 $\pm$ 1,92 ^a	2,00 $\pm$ 1,73 ^a
G2	6,54 $\pm$ 0,75 ^{abc}	32,00 $\pm$ 2,12 ^{ab}	59,40 $\pm$ 3,57 ^a	3,20 $\pm$ 0,44 ^a	2,44 $\pm$ 1,50 ^a
G3	5,15 $\pm$ 0,38 ^{ab}	33,50 $\pm$ 2,34 ^{ab}	59,83 $\pm$ 2,48 ^a	3,33 $\pm$ 2,25 ^a	3,33 $\pm$ 3,12 ^a
G4	6,82 $\pm$ 1,92 ^{abc}	34,42 $\pm$ 2,29 ^{ab}	61,85 $\pm$ 2,11 ^a	3,28 $\pm$ 1,38 ^a	3,33 $\pm$ 2,29 ^a
G5	7,17 $\pm$ 1,48 ^{bc}	35,28 $\pm$ 4,19 ^b	63,00 $\pm$ 5,94 ^{ab}	2,57 $\pm$ 1,61 ^a	2,11 $\pm$ 1,53 ^a
G6	7,98 $\pm$ 1,03 ^c	37,12 $\pm$ 4,67 ^{bc}	65,12 $\pm$ 9,04 ^{ab}	3,25 $\pm$ 1,28 ^a	2,50 $\pm$ 0,97 ^a
G7	7,81 $\pm$ 2,95 ^{bc}	37,71 $\pm$ 4,57 ^{bc}	65,71 $\pm$ 6,62 ^{ab}	3,14 $\pm$ 2,03 ^a	3,40 $\pm$ 0,51 ^a
G8	8,15 $\pm$ 0,42 ^c	42,50 $\pm$ 3,88 ^c	72,50 $\pm$ 5,16 ^b	3,83 $\pm$ 1,72 ^a	3,75 $\pm$ 1,48 ^a

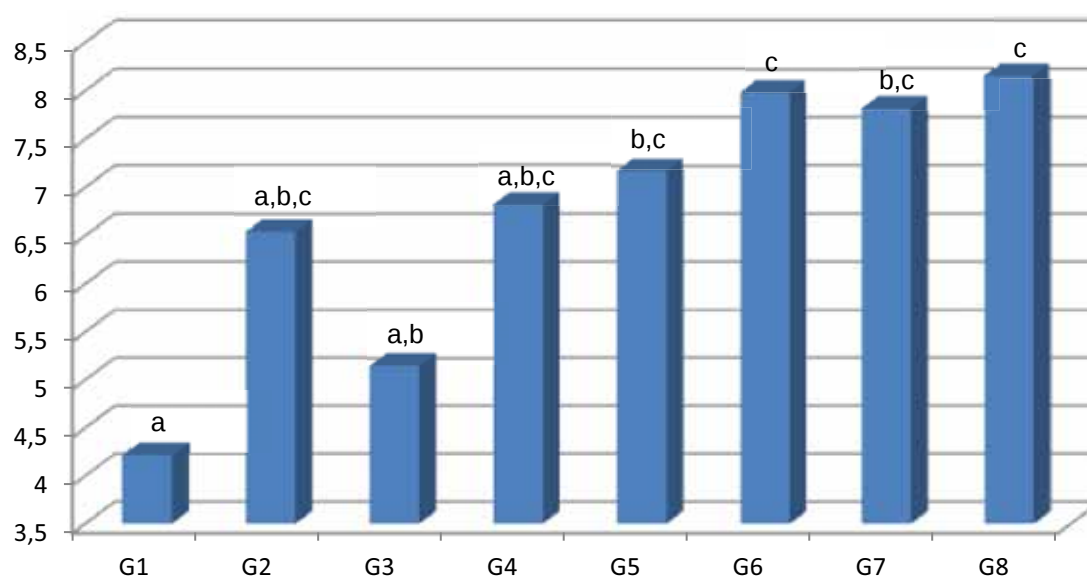
*Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos

Pode-se observar aumento na contagem de hemácias, volume globular e hemoglobina quando da presença de infecções e/ou diabetes, mas não houve diferença estatística entre os grupos ($p>0.05$) (tabela 2). Os resultados para CHCM, monócitos e eosinófilos não mostraram diferença estatística ($p>0.05$), como também não apresentaram discrepância nos valores obtidos (tabela 3).

Observou-se diferenças significativamente estatísticas ($p<0.05$) nos resultados para VCM, leucócitos, neutrófilos e linfócitos. O teste de comparações múltiplas de Tukey foi usado para identificar as diferenças entre os grupos (tabelas 2 e 3).

Gráfico 1 – Projeção gráfica dos resultados para volume corpuscular médio (fL)

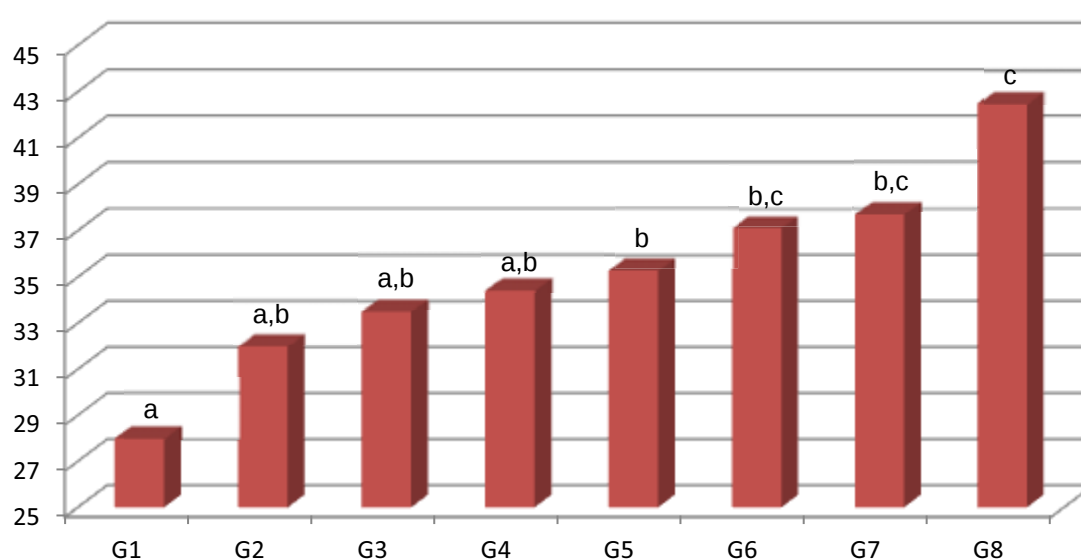
O VCM de ratos diabéticos foi maior que em ratos dos grupos não diabéticos, independente da associação com infecções orais. Não houve diferença estatística entre o grupo 5 e os grupos 6, 7 ou 8 e entre o grupo 4 e os grupos 1, 2 ou 3 (tabela 2, gráfico 1).

Gráfico 2 – Projeção gráfica dos resultados para leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)

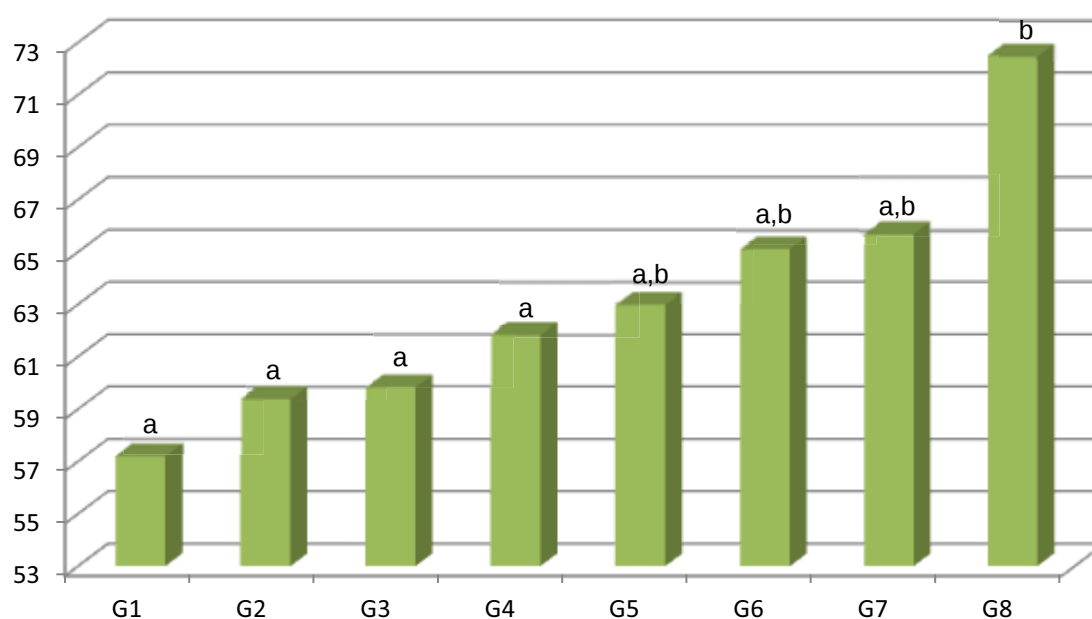
A contagem de leucócitos de ratos diabéticos com infecção pulpar e ratos

diabéticos com infecção pulpar e periodontal, G6 e G8 respectivamente, foi estatisticamente significante maior que em ratos normais e ratos com infecção periodontal, G1 e G3 respectivamente, indicando que a infecção endodôntica em ratos com diabetes aumenta o número de leucócitos. Também houve diferença entre o grupo 1 e os grupos 5 e 7, mostrando que a diabetes causa um aumento do número de leucócitos quando comparado com o grupo controle (tabela 3, gráfico 2).

Gráfico 3 – Projeção gráfica dos resultados para neutrófilos (%)



Houve aumento do número de neutrófilos, com a diferença estatística significante entre o grupo 8 e os grupos 1, 2, 3, 4 e 5. A presença das infecções pulpar e periodontal associadas com a diabetes elevou consideravelmente o número de neutrófilos. Também houve diferença entre o grupo 1 e os grupos 5, 6 e 7, mostrando que os neutrófilos estão aumentados em ratos diabéticos com ou sem infecções, quando comparados com ratos normais (tabela 3, gráfico 3).

Gráfico 4 – Projeção gráfica dos resultados para linfócitos (%)

A presença de ambas as infecções em ratos diabéticos (G8) influenciaram no aumento do número de linfócitos em comparação com ratos não diabéticos, independente da presença de infecções locais. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo 8 e os grupos 1, 2, 3 e 4 (tabela 3, gráfico 4).

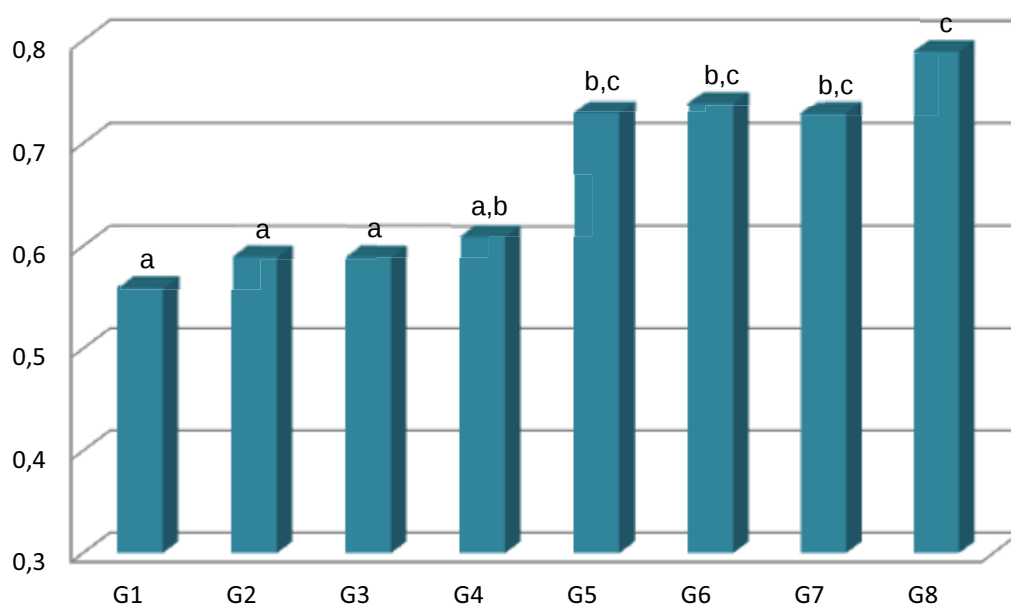
5.2. Dosagem de Creatinina

Os valores obtidos para a dosagem de creatinina e os resultados dos testes estatísticos estão apresentados na tabela 4 e no gráfico 5.

Tabela 4 - Média e desvio padrão dos níveis séricos de creatinina (mg/dL).

Grupo	Creatinina (Média±DV *)
G1	0,56±0,09 ^a
G2	0,59±0,04 ^a
G3	0,59±0,05 ^a
G4	0,61±0,06 ^{ab}
G5	0,73±0,10 ^{bc}
G6	0,74±0,14 ^{bc}
G7	0,73±0,08 ^{bc}
G8	0,79±0,08 ^c

*Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos

Gráfico 5 – Projeção gráfica dos resultados para dosagem de creatinina (mg/dL)

Os níveis séricos de creatinina foram similares nos grupos não diabéticos ($p>0.05$) ou nos grupos diabéticos ($p>0.05$). Entretanto, os grupos de 1 a 4 exibiram baixos níveis de creatinina enquanto que os grupos de 5 a 8 revelaram valores mais elevados (tabela 8, gráfico 3). Os níveis séricos de creatinina foram maiores em ratos diabéticos (G5) em relação aos ratos normoglicêmicos (G1) ($p<0.05$). Ratos diabéticos com infecção endodôntica e periodontal (G8) mostraram níveis de creatinina estatisticamente mais elevados quando comparados com ratos não diabéticos (G1 a G4). Os ratos normoglicêmicos com infecção endodôntica e periodontal (G4) apresentaram níveis séricos de creatinina similares aos do grupo de ratos diabéticos sem infecções (G5) (tabela 4, gráfico 5).

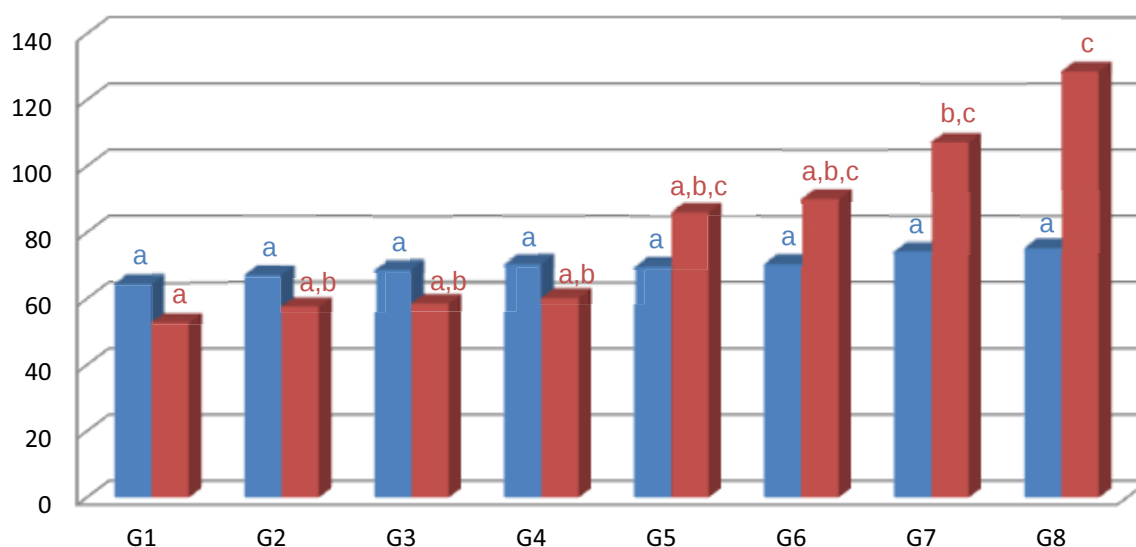
5.3. Dosagem de Triglicérides e Colesterol

Os valores obtidos para a dosagem de triglicérides e colesterol e os resultados dos testes estatísticos estão apresentados na tabela 5. Os níveis de colesterol total foram similares em todos os espécimes avaliados (tabela 5, gráfico 6), enquanto os níveis de triglicérides apresentaram diferença estatística para alguns grupos (tabela 5, gráfico 6).

Tabela 5 – Média e desvio padrão dos níveis de colesterol e triglicérides (mg/dL).

Grupo	Lípídeos (Média±DV *)	
	<i>Colesterol (mg/dL)</i>	<i>Triglicérides (mg/dL)</i>
G1	64,80±12,91 ^a	53,11±12,32 ^a
G2	67,40±12,50 ^a	57,66±11,16 ^{ab}
G3	69,16±11,42 ^a	58,77±21,97 ^{ab}
G4	70,80±10,56 ^a	60,44±16,10 ^{ab}
G5	69,85±11,90 ^a	86,44±26,63 ^{abc}
G6	70,87±8,45 ^a	90,42±25,82 ^{abc}
G7	74,42±9,60 ^a	107,50±28,13 ^{bc}
G8	75,83±13,41 ^a	129,00±26,77 ^c

*Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos.

Gráfico 6 – Projeção gráfica dos resultados para dosagem de colesterol e triglicérides (mg/dL)

Os níveis de triglicérides foram similares para todos os ratos dos grupos não diabéticos (G1 a G4) ($p>0.05$). Entretanto, os animais dos grupos 1 a 4 apresentaram taxas de triglicérides menores quando comparados com os animais dos grupos 5 a 8 (Tabela 5, gráfico 6).

Para os ratos diabéticos com infecção periodontal (G7) e diabéticos com infecção endodôntica e periodontal (G8), os níveis de triglicérides estavam significativamente maiores que em ratos normais (G1) ($p<0.05$). Já os ratos diabéticos com ambas as infecções (G8) obtiveram níveis mais elevados do que todos os grupos de ratos não diabéticos (G1 a G4) ($p<0.05$) (tabela 5, gráfico 6).

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1. Da metodologia

Estudos em pacientes são influenciados por outras variáveis, como sexo, idade, fumo e condição de saúde bucal. Estes aspectos são minimizados em pesquisas com animais pelo fato dos experimentos serem conduzidos com espécimes do mesmo sexo, mesma idade e apenas um dente com doença periodontal ou endodôntica. Incluindo em alguns grupos a doença sistêmica diabetes.

Para o estudo foram utilizados animais da mesma idade (2 meses), com peso uniforme e normoglicêmicos. O modelo animal, particularmente o rato, é comumente utilizado em pesquisas por possibilitar a padronização dos espécimes e ser representativo para a correlação com estudos em humanos (Azeez et al., 2010; López et al., 2011).

A droga de escolha para indução da diabetes mellitus foi a estreptozotocina, pois é uma droga segura e tem sido utilizada em diversas experimentações com alto índice de sucesso no percentual de indução (Leite et al., 2008; Garber et al., 2009). Inicialmente a streptozotocina foi caracterizada como um antimicrobiano de amplo espectro. Posteriormente foi verificada sua capacidade de promover diabetes em cães e ratos. A droga tem efeito citotóxico por destruir as células β -pancreáticas, responsáveis pela formação das ilhotas pancreáticas. Sem essas células o pâncreas não produz insulina, implicando na condição diabética do indivíduo (Delfino et al., 2002).

O método utilizado para indução da infecção pulpar produziu alterações semelhantes entre os espécimes de um mesmo grupo, confirmadas por análise microscópica das maxilas. Este aspecto denota que a indução foi realizada com sucesso e pode ser empregada em estudos que envolvem os tecidos do endodonto, assim como demonstrado em outros estudos (Iwama et al., 2003; Armada-Dias et al., 2006).

Quanto ao método de indução da doença periodontal, foi realizada a indução baseada no estudo de Holzhausen e colaboradores (Holzhausen et al.,

2002). Observou-se semelhança entre espécimes do mesmo grupo de doença periodontal confirmados por análise microscópica das maxilas, evidenciando a confiança no método empregado para o estudo dos tecidos periodontais, como demonstrado em outras experimentações (Liu et al., 2006; Bezerra et al., 2008; Gomes et al., 2009).

6.2. Dos resultados do hemograma

A interação da diabetes com a doença periodontal é interesse de vários grupos de pesquisa (Preshaw et al., 2012; Mealey & Ocampo, 2007; Watanabe et al., 2008). O hemograma é frequentemente utilizado para avaliar a presença de infecção ou inflamação, e a questão é saber se a doença periodontal afeta os parâmetros hematológicos como a contagem de células da série branca, série vermelha e/ou plaquetas (López et al., 2012).

Contrapondo os achados no presente trabalho, estudos hematológicos em pacientes com doença periodontal mostraram um baixo número na contagem de hemácias, baixos níveis de hemoglobina e hematócrito comparados com indivíduos controle (Hutter et al., 2001; Yamamoto et al., 2011), tais parâmetros não estavam alterados neste trabalho.

A diabetes foi responsável pelo aumento do VCM em ratos, sem associação com as infecções orais. Mesmo com diferença estatística significativa ($p < 0.05$), o VCM está dentro da faixa de normalidade encontrada em outros estudos realizados em ratos (Nemeth et al., 2010; Dallak, 2009; Anand et al., 2010), ou seja, os ratos diabéticos apresentavam VCM próximo ao valor máximo aceitável, enquanto que os normoglicêmicos apresentavam valores próximo ao mínimo aceitável. Essa discrepância de valores mostrou que há diferença estatisticamente significativa entre animais diabéticos e normoglicêmicos.

Os leucócitos, envolvidos na defesa contra patógenos, monitoramento e eliminação de antígenos não próprios, podem estar presentes ou alterados no sangue quando da presença de infecções locais (Gkrania-Klotsas et al., 2010). Os neutrófilos são as células mais abundantes dos leucócitos, constituindo entre 50 a 70%, e seu número aumentado é comumente observado em infecções bacterianas (Grotto, 2009), como observado em infecções endodônticas e periodontais. O presente trabalho corrobora com os dados da literatura, somando-se ainda o fato de que nos animais diabéticos os leucócitos, neutrófilos e linfócitos estavam mais elevados quando comparados com os animais normoglicêmicos.

O aumento de leucócitos demonstra como a presença da diabetes pode

influenciar nas infecções orais. Isto se torna evidente quando comparamos os grupos com infecções, mas sem diabetes (G2, G3 e G4) e os grupos com infecções e diabetes (G6, G7 e G8).

Não houve alterações nos monócitos e eosinófilos, uma vez que esses tipos celulares são comumente encontrados em parasitoses e alergias respectivamente (Theml, et al., 2004), e não eram os tipos de infecções presentes neste estudo, pois os animais permaneceram em ambiente controlado por todo o período experimental.

Estes resultados sugerem que a diabetes influencia no aumento do volume das hemácias (VCM) e a presença das infecções orais em ratos diabéticos aumenta o número de leucócitos e a contagem de neutrófilos e linfócitos.

6.3. Dos resultados da creatinina

Este estudo avaliou a interferência das infecções orais nos níveis séricos de creatinina em ratos normoglicêmicos e diabéticos. Alterações significativas nos níveis séricos de creatinina podem ser indícios de disfunção renal (Spanaus et al., 2010).

Os animais diabéticos apresentaram níveis de creatinina mais elevados quando comparados com animais normoglicêmicos e essa diferença foi ainda maior quando da presença das infecções orais. Outros autores também mostraram a relação entre doença periodontal e disfunção renal (Yoshihara et al., 2007, Yoshihara et al., 2011) e doença periodontal em indivíduos diabéticos e sua relação com a falência renal (Akar et al., 2011).

Os resultados deste trabalho corroboram com outros achados na literatura, mostrando que tanto a diabetes quanto a doença periodontal elevam os níveis de creatinina sérica. Além disso, fica aqui também registrado a relação das infecções orais com o ligeiro aumento do nível de creatinina tanto em ratos normoglicêmicos quanto diabéticos, particularmente quando ambas estão associadas.

6.4. Dos resultados dos triglicérides e colesterol

As alterações nos parâmetros lipídicos, como colesterol, triglicérides e lipoproteínas de baixa densidade, são algumas das complicações crônicas da diabetes (Pinto & Moretto, 2004). Infecções orais, diabetes e hiperlipidemia foram correlacionadas e associadas com doenças cardiovasculares (Albandar, 2002; Mattila et al., 2005; Boodhwani & Sellke, 2009), sendo a doenças cardiovasculares as que representam a maior causa de morte em pacientes diabéticos tipo II (Pinto & Moretto, 2004).

No presente estudo, apesar de um pequeno aumento nos níveis de colesterol total nos ratos diabéticos com doenças pulpares e periodontais, os valores não foram estatisticamente significantes ($p>0.05$).

Os resultados mostraram que a diabetes, as infecções pulpares e as periodontais elevaram os níveis de triglicérides. Alguns estudos também mostraram altos níveis de triglicérides em ratos diabéticos, pacientes diabéticos e modelos de periodontite experimental (Tunali & Yanardag, 2006; El-Sayyad et al., 2012). Esse aumento nos níveis de triglicérides em ratos diabéticos pode ser devido à falta de insulina, que normalmente ativa a lipoproteína lipase, enzima responsável por hidrolisar as moléculas de triglicérides. Por outro lado quanto às infecções orais tal mecanismo ainda carece de informações.

7. Conclusão

7. CONCLUSÃO

Diante da metodologia empregada e de acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- ✓ A diabetes provocou aumento no volume das hemácias (VCM) e a interação da diabetes com as infecções endodônticas e/ou periodontais ocasionou aumento na contagem dos leucócitos, neutrófilos e linfócitos;
- ✓ A diabetes elevou os níveis de creatinina sérica, independente da presença de infecção pulpar e/ou periodontal;
- ✓ A presença de ambas as infecções, pulpar e periodontal, elevaram os níveis de triglicérides em ratos diabéticos;
- ✓ Nenhuma interação entre diabetes, infecção endodôntica ou infecção periodontal foi capaz de alterar parâmetros como contagem de hemácias, volume globular, hemoglobina, concentração de hemoglobina corpuscular média, monócitos, eosinófilos e colesterol.

8. Bibliografia

8. Bibliografia

1. Agarwal N, Kumar VS, Gujjari SA. Effect of periodontal therapy on hemoglobin and erythrocyte levels in chronic generalized periodontitis patients: An interventional study. J Indian Soc Periodontol. 2009 Jan;13(1):6-11.
2. Akar H, Akar GC, Carrero JJ, Stenvinkel P, Lindholm B. Systemic consequences of poor oral health in chronic kidney disease patients. Clin J Am Soc Nephrol. 2011 Jan;6(1):218-26.
3. Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. Periodontol 2000. 2002; 29:177-206.
4. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2004; 27 Suppl 1:S5-S10.
5. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. Diabetes Care. 2006; 29 Suppl 1:S4-S36.
6. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. Diabetes Care 2010; 33 (Suppl. 1): 10-S011.
7. Amir J, Waite M, Tobler J, Catalfamo DL, Koutouzis T, Katz J, Wallet SM. The role of hyperglycemia in mechanisms of exacerbated inflammatory responses within the oral cavity. Cell Immunol. 2011;272(1):45-52.
8. Anand P, Rajakumar D, Felix AJW, Balasubramanian T. Effects of oral administration of antioxidant taurine on haematological parameters in Wistar rats. [Internet]. Pakistan journal of biological sciences: PJBS. 2010 Aug 15;13(16):785–93.
9. Armada-Dias L, Breda J, Provenzano JC, Breitenbach M, Rôças IN, Gahyva SM, Siqueira Junior JF. Development of periradicular lesions in normal and diabetic rats. J Appl Oral Sci. 2006; 14(5):371-5.
10. Awuti G, Younusi K, Li L, Upur H, Ren J. Epidemiological survey on the prevalence of periodontitis and diabetes mellitus in uyghur adults from rural hotan area in xinjiang. Exp Diabetes Res. 2012;2012:758921.

11. Azeez OI, Oyagbemi AA, Oyeyemi MO, Odetola AA. Ameliorative effects of *Cnidioscolus aconitifolius* on alloxan toxicity in Wistar rats. *Afr Health Sci*. 2010 Sep;10(3):283-91.
12. Baig MA, Gawali VB, Patil RR, Naik SR. Protective effect of herbomineral formulation (Dolabi) on early diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nat Med*. 2011 Nov 25. [Epub ahead of print].
13. Bender IB, Bender AB. Diabetes mellitus and the dental pulp. *J Endod* 2003; 29(6):383-9.
14. Bezerra JP, da Silva LR, de Alvarenga Lemos VA, Duarte PM, Bastos MF. Administration of high doses of caffeine increases alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2008 Dec;79(12):2356-60.
15. Boodhwani M, Sellke FW. Therapeutic angiogenesis in diabetes and hypercholesterolemia: influence of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11(8):1945-59.
16. Carneiro VM, Bezerra AC, Guimarães Mdo C, Muniz-Junqueira MI. Decreased phagocytic function in neutrophils and monocytes from peripheral blood in periodontal disease. *J Appl Oral Sci*. 2012 Sep-Oct;20(5):503-9.
17. Catanzaro O, Dziubecki D, Lauria LC, Ceron CM, Rodriguez RR. Diabetes and its effects on dental pulp. *J Oral Sci*. 2006; 48(4):195-9.
18. Chala S, Abouqal R, Abdallaoui F. Prevalence of apical periodontitis and factors associated with the periradicular status. *Acta Odontol Scand*. 2011 Nov;69(6):355-9.
19. Cotran RS, Collins T, Kumar V. Robbins patologia estrutural e funcional, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 817-829, 2000.
20. Cotti E, Dessì C, Piras A, Flore G, Deidda M, Madeddu C, Zedda A, Longu G, Mercurio G. Association of endodontic infection with detection of an initial lesion to the cardiovascular system. *J Endod*. 2011 Dec;37(12):1624-9.
21. Dallak M. Camel's Milk Protects Against Cadmium Chloride-Induced Hypochromic Microcytic Anemia and Oxidative Stress in Red Blood Cells of White Albino Rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2009;4(4):136–43.

22. Dalton RN. Serum creatinine and glomerular filtration rate: perception and reality. Clin Chem. 2010 May;56(5):687-9.
23. Davies RC, Jaedicke KM, Barksby HE, Jitprasertwong P, Al-Shahwani RM, Taylor JJ, Preshaw PM. Do patients with aggressive periodontitis have evidence of diabetes? A pilot study. J Periodontal Res. 2011 Dec;46(6):663-72.
24. Delfino VDA, Figueiredo JF, Matsuo T, Favero ME, Matni AM, Mocelin AJ. Streptozotocin-induced diabetes mellitus: long-term comparison of two drug administration routes. J Bras Nefrol 2002;24(1):31-6.
25. Demirtunc R, Duman D, Basar M, Bilgi M, Teomete M, Garip T. The relationship between glycemic control and platelet activity in type 2 diabetes mellitus. J Diabetes Complications. 2009 Mar-Apr;23(2):89-94.
26. Deshpande K, Jain A, Sharma R, Prashar S, Jain R. Diabetes and periodontitis. J Indian Soc Periodontol. 2010 Oct;14(4):207-12.
27. Díaz-Romero RM, Casanova-Román G, Beltrán-Zuñiga M, Belmont-Padilla J, Méndez JD, Avila-Rosas H. Oral infections and glycemic control in pregnant type 2 diabetics. Arch Med Res. 2005 Jan-Feb;36(1):42-8.
28. Ekmekcioglu C, Prohaska C, Pomazal K, Steffan I, Schernthaner G, Marktl W. Concentrations of seven trace elements in different hematological matrices in patients with type 2 diabetes as compared to healthy controls. Biol Trace Elem Res. 2001 Mar;79(3):205-19.
29. El-Sayyad HI, Al-Haggar MS, El-Ghawet HA, Bakr IH. Cardiomyopathy and angiogenesis defects of Wistar rat fetuses of diabetic and hypercholesterolemic mothers. Nutrition. 2012 Apr 20. [Epub ahead of print].
30. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. J Periodontol 1991; 62(2):123-31.
31. Fentoğlu Ö, Köroğlu BK, Hiçyılmaz H, Sert T, Özdem M, Sütçü R, Tamer MN, Orhan H, Ay ZY, Öztürk Tonguç M, Kirzioğlu FY. Pro-inflammatory cytokine levels in association between periodontal disease and hyperlipidaemia. J Clin Periodontol. 2011 Jan;38(1):8-16.
32. Fentoğlu O, Sözen T, Oz SG, Kale B, Sönmez Y, Tonguç MO, Gürgan CA, Aykaç Y, Kirzioğlu FY. Short-term effects of periodontal therapy as an adjunct to anti-lipemic treatment. Oral Dis. 2010 Oct;16(7):648-54.

33. Ficara AJ, Levin MP, Grower MF, Kramer GD. A comparison of the glucose and protein content of gingival fluid from diabetics and nondiabetics. *J Periodontal Res* 1975; 10:171-5.
34. Finamor IA, Saccol EM, Gabriel D, Ourique GM, Riffel AP, Konrad SP, Belló-Klein A, Partata W, Baldisserotto B, Llesuy SF, Pavanato MA. Effects of parboiled rice diet on oxidative stress parameters in kidney of rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Med Food*. 2012 Jul;15(7):598-604. Epub 2012 Apr 17.
35. Fouad A, Barry J, Russo J, Radolf J, Zhu Q. Periapical lesion progression with controlled microbial inoculation in a type I diabetic mouse model. *J Endod*. 2002 Jan;28(1):8-16.
36. Fouad AF, Burleson J. The effect of diabetes mellitus on endodontic treatment outcome: data from an electronic patient record. *J Am Dent Assoc*. 2003 Jan;134(1):43-51.
37. Fouad AF. Diabetes mellitus as a modulating factor of endodontic infections. *J Dent Educ*. 2003; 67(4):459-67.
38. Garber SE, Shabahang S, Escher AP, Torabinejad M. The effect of hyperglycemia on pulpal healing in rats. *J Endod*. 2009 Jan;35(1):60-2.
39. Gkrania-Klotsas E, Ye Z, Cooper AJ, Sharp SJ, Luben R, Biggs ML, Chen LK, Gokulakrishnan K, Hanefeld M, Ingelsson E, Lai WA, Lin SY, Lind L, Lohsoonthorn V, Mohan V, Muscari A, Nilsson G, Ohrvik J, Chao Qiang J, Jenny NS, Tamakoshi K, Temelkova-Kurktschiev T, Wang YY, Yajnik CS, Zoli M, Khaw KT, Forouhi NG, Wareham NJ, Langenberg C. Differential white blood cell count and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of cross-sectional and prospective studies. *PLoS One*. 2010 Oct 18;5(10):e13405. Review.
40. Gomes DA, Spolidorio DM, Pepato MT, Zuza EP, de Toledo BE, Gonçalves A, Spolidorio LC, Pires JR. Effect of induced diabetes mellitus on alveolar bone loss after 30 days of ligature-induced periodontal disease. *J Int Acad Periodontol*. 2009 Apr;11(2):188-92.

41. Gross JL, Nehme M. Detection and treatment of chronic complications of diabetes mellitus: Consensus of the Brazilian Diabetes Society and the Brazilian Ophthalmology Council. *Rev Assoc Med Bras.* 1999 Jul-Sep;45(3):279-84. Review.
42. Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol.* 1998; 3(1):51-61.
43. Grossi, S.C. Treatment of periodontal disease and controle f diabetes: an assessment of the evident and need for future research. *Ann. Periodontol.* 2001; 6: 138-45.
44. Grotto HZW. O hemograma: importância para a interpretação da biópsia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia [Internet].* 2009;31(3):178–82.
45. Gus I, Harzheim E, Zaslavsky C, Medina C, Gus M. Prevalence, awareness, and control of systemic arterial hypertension in the state of Rio Grande do Sul. *Arq Bras Cardiol.* 2004 Nov;83(5):429-33; 424-8. Epub 2004 Nov 11. English, Portuguese.
46. Harita N, Hayashi T, Sato KK, Nakamura Y, Yoneda T, Endo G, Kambe H. Lower serum creatinine is a new risk factor of type 2 diabetes: the Kansai healthcare study. *Diabetes Care.* 2009 Mar;32(3):424-6.
47. Herring ME, Shah SK. Periodontal disease and control of diabetes mellitus. *J Am Osteopath Assoc.* 2006; 106(7):416-21.
48. Hoffman R, Benz-Jr EJ, Silberstein LE, Heslop H, Weitz J, Anastasi J. *Hematology: basic principles and practice.* 6ª ed. Elsevier, 2012. 2380 p.
49. Holzhausen M, Rossa Júnior C, Marcantonio Júnior E, Nassar PO, Spolidório DM, Spolidório LC. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 2002; 73(9):1030-6.
50. Hutter JW, Velden U van der, Varoufaki A, Huffels RAM, Hoek FJ, Loos BG. Lower numbers of erythrocytes and lower levels of hemoglobin in
51. Ioannidou E, Hall Y, Swede H, Himmelfarb J. Periodontitis associated with chronic kidney disease among Mexican Americans. *J Public Health Dent.* 2012 Jul 6. doi: 10.1111/j.1752-7325.2012.00350.x. [Epub ahead of print]

52. Ioannidou E, Swede H. Disparities in periodontitis prevalence among chronic kidney disease patients. *J Dent Res*. 2011 Jun;90(6):730-4.
53. Iwama A, Nishigaki N, Nakamura K, Imaizumi I, Shibata N, Yamasaki M, Nakamura H, Kameyama Y, Kapila Y. The effect of high sugar intake on the development of periradicular lesions in rats with type 2 diabetes. *J Dent Res* 2003; 82(4):322-5.
54. Keane WF, Tomassini JE, Neff DR. Lipid Abnormalities in Patients with Chronic Kidney Disease: Implications for the Pathophysiology of Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2012 Oct 25. [Epub ahead of print]
55. King DE, Mainous AG 3rd, Buchanan TA, Pearson WS. C-reactive protein and glycemic control in adults with diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26(5):1535-9.
56. Kodama Y, Matsuura M, Sano T, Nakahara Y, Ozaki K, Narama I, Matsuura T. Diabetes enhances dental caries and apical periodontitis in caries-susceptible WBN/KobSlc rats. *Comp Med*. 2011; 61(1): 53-9.
57. Kohsaka T, Kumazawa M, Yamasaki M, Nakamura H. Periapical lesions in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Endod*. 1996 Aug;22(8):418-21
58. Lakschevitz F, Aboodi G, Tenenbaum H, Glogauer M. Diabetes and periodontal diseases: interplay and links. *Curr Diabetes Rev*. 2011 Nov 1;7(6):433-9.
59. Leite MF, Ganzerla E, Marques MM, Nicolau J. Diabetes induces metabolic alterations in dental pulp. *J Endod* 2008; 34(10):1211-4.
60. Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, Graves DT. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res*. 2006 Jun;85(6):510-4.
61. López R, Loos BG, Baelum V. Hematological features in adolescents with periodontitis. *Clin Oral Investig*. 2012; 16(4):1209-16.
62. López-López J, Jané-Salas E, Estrugo-Devesa A, Velasco-Ortega E, Martín-González J, Segura-Egea JJ. Periapical and endodontic status of type 2 diabetic patients in Catalonia, Spain: a cross-sectional study. *J Endod*. 2011 May;37(5):598-601.

63. Ma Z, Wang Y, Zhu X, Zhang C, Li S, Jin L, Shen Y, Haapasalo M. Role of polymorphonuclear neutrophils in the clearance of *Enterococcus faecalis* derived from saliva and infected root canals. *J Endod*. 2011 Mar;37(3):346-52.
64. Malandrino N, Wu WC, Taveira TH, Whitlatch HB, Smith RJ. Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes. *Diabetologia*. 2011 Oct 15. [Epub ahead of print].
65. Marcotte L, Godwin M. Natural history of elevated creatinine levels. *Can Fam Physician*. 2006 Oct;52(10):1264-5.
66. Marette A. Mediators of cytokine-induced insulin resistance in obesity and other inflammatory settings. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002 Jul;5(4):377-83. Review.
67. Marotta PS, Fontes TV, Armada L, Lima KC, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Type 2 diabetes mellitus and the prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment in an adult Brazilian population. *J Endod*. 2012 Mar;38(3):297-300. Epub 2011 Dec 22.
68. Mattila KJ, Pussinen PJ, Paju S. Dental infections and cardiovascular diseases: a review. *J Periodontol*. 2005 Nov;76(11 Suppl):2085-8.
69. Mealey BL, Oates TW. Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol* 2006; 77(8):1289-1303.
70. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2007; 44: 127-53.
71. Mealey BL, Rose LF. Diabetes mellitus and inflammatory periodontal diseases. *Compend Contin Educ Dent*. 2008; 29(7):402-8, 410, 412-3.
72. Messier MD, Emde K, Stern L, Radhakrishnan J, Vernocchi L, Cheng B, Angelopoulos C, Papapanou PN. Radiographic periodontal bone loss in chronic kidney disease. *J Periodontol*. 2012 May;83(5):602-11. Epub 2011 Nov 7.
73. Mindiola MJ, Mickel AK, Sami C, Jones JJ, Lalumandier JA, Nelson SS. Endodontic treatment in an American Indian population: a 10-year retrospective study. *J Endod*. 2006 Sep;32(9):828-32.

74. Minelli L, Salmazo JC, Marcondes M, Nonino AB, Neme L. Diabetes mellitus and cutaneous affections. *An bras Dermatol*, Rio de Janeiro, 78(6):735-747, nov./dez. 2003.
75. Moore PA, Guggenheimer J, Etzel KR, Weyant RJ, Orchard T. Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92:281-91.
76. Morsch C, Gonçalves LF, Barros E. Renal disease severity index, clinical indicators and mortality of patients in hemodialysis. *Rev Assoc Med Bras*. 2005 Sep-Oct;51(5):296-300.
77. Murussi M, Coester A, Gross JL, Silveiro SP. Nefropatia diabética no diabetes mellitus tipo 2: fatores de risco e prevenção. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003;47/3:207-219.
78. Nemeth N, Kiss F, Furka I, Miko I. Gender differences of blood rheological parameters in laboratory animals. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2010 Jan ;45(2-4):263–72.
79. Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of non-surgical root canal treatment: part 2: tooth survival. *Int Endod J*. 2011 Jul;44(7):610-25.
80. Odagiri K, Uehara A, Mizuta I, Yamamoto M, Kurata C. Longitudinal study on white blood cell count and the incidence of metabolic syndrome. *Intern Med*. 2011;50(21):2491-8.
81. Peters LB, Lindeboom JA, Elst ME, Wesselink PR. Prevalence of apical periodontitis relative to endodontic treatment in an adult Dutch population: a repeated cross-sectional study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Apr;111(4):523-8.
82. Pinto AB, Moretto MB. Diabetes mellitus e fatores de risco em pacientes ambulatoriais. *NewsLab*. 2004; 66: 106-18.
83. Pradeep AR, Anuj S, Arjun Raju P. Anemia of chronic disease and chronic periodontitis: does periodontal therapy have an effect on anemic status? *J Periodontol*. 2011 Mar;82(3):388-94.
84. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, Taylor R. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012 Jan;55(1):21-31.

85. Pussinen PJ, Könönen E, Paju S, Hyvärinen K, Gursoy UK, Huuonen S, Knuuttila M, Suominen AL. Periodontal pathogen carriage, rather than periodontitis, determines the serum antibody levels. *J Clin Periodontol*. 2011 May;38(5):405-11.
86. Rezende EM, Sampaio IBM, Ishitani LH. Causas múltiplas de morte por doenças crônico-degenerativas: uma análise multidimensional. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 20(5):1223-1231, set-out, 2004
87. Rojo-Botello NR, García-Hernández AL, Moreno-Fierros L. Expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 is increased in gingival tissue from patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontal Res*. 2011 Aug 17 [Epub ahead of print].
88. Saba AB, Oyagbemi AA, Azeez OI. Antidiabetic and haematinic effects of *Parquetina nigrescens* on alloxan induced type-1 diabetes and normocytic normochromic anaemia in Wistar rats. *Afr Health Sci*. 2010 Sep;10(3):276-82.
89. Sandhaus Lm, Meyer P. How useful are CBC and reticulocyte reports to clinicians? *Am J Clin Pathol*. 2002;118(5):787-93.
90. Santos FBF, Balzanelli ES, D'Andrade MRP. Avaliação do perfil lipídico de pacientes diabéticos e hipertensos tratados com captopril. *J Bras Patol Med Lab*. 2009; 45 (3): 207-12.
91. Siudikiene J, Machiulskiene V, Nyvad B, Tenovou J, Nedzelskiene I. Dental caries increments and related factors in children with type 1 diabetes mellitus. *Caries Res* 2008; 42(5):354-62.
92. Sociedade Brasileira de Diabetes. Calcule o número de diabéticos na sua cidade. Acesso em agosto de 2011. Disponível em <http://www.diabetes.org.br/para-o-publico/calculadoras/numero-de-diabeticos>.
93. Somma F, Castagnola R, Bollino D, Marigo L. Oral inflammatory process and general health. Part 1: The focal infection and the oral inflammatory lesion. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2010 Dec;14(12):1085-95. Review.

94. Sousa RR, Castro RD, Monteiro CH, Silva SC, Nunes AB. Buccal attendance of the patient with diabetes mellitus: a revision of literature. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr, Jo o Pessoa*, v. 3, n. 2, p. 71-77, jul./dez. 2003.
95. Spanaus KS, Kollerits B, Ritz E, Hersberger M, Kronenberg F, von Eckardstein A. Serum creatinine, cystatin C, and beta-trace protein in diagnostic staging and predicting progression of primary nondiabetic chronic kidney disease. *Clin Chem*. 2010 May; 56(5):740-9.
96. Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FA, Bertolami MC, Afiune Neto A, Souza AD, Lottenberg AM, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. [IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]. *Arq Bras Cardiol*. 2007 Apr;88 Suppl 1:2-19.
97. Sridhar R, Byakod G, Pudakalkatti P, Patil R. A study to evaluate the relationship between periodontitis, cardiovascular disease and serum lipid levels. *Int J Dent Hyg*. 2009 May;7(2):144-50.
98. Streja D, Cressey P, Rabkin SW. Associations between inflammatory markers, traditional risk factors, and complications in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2003; 17(3):120-7.
99. Taleghani F, Shamaei M, Shamaei M. Association between chronic periodontitis and serum lipid levels. *Acta Med Iran*. 2010 Jan-Feb;48(1):47-50.
100. Tan KC, Chow WS, Tam S, Bucala R, Betteridge J. Association between acute-phase reactants and advanced glycation end products in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27(1):223-8.
101. Tang WX, Wu WH, Zeng XX, Bo H, Huang SM. Early protective effect of mitofusion 2 overexpression in STZ-induced diabetic rat kidney. *Endocrine*. 2011 Nov 18. [Epub ahead of print].
102. Thöml H, Diem H, Haferlach T. *Color Atlas of Hematology*. Thieme, 2004, 2^oed, 209 p.
103. Thorstensson J, Falk H, Hugoson A, Olsson J. Some salivary factors in insulin-dependent diabetics. *Acta Odont Scand* 1979; 47:175-83

104. Tunali S, Yanardag R. Effect of vanadyl sulfate on the status of lipid parameters and on stomach and spleen tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res.* 2006 Mar;53(3):271-7.
105. Ünübol M, Ayhan M, Güney E. The relationship between mean platelet volume with microalbuminuria and glycemic control in patients with type II diabetes mellitus. *Platelets.* 2011 Nov 29. [Epub ahead of print].
106. US Renal Data System. *USRDS 1998 Annual Data Report; Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States.* National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; Bethesda, MD, April 1998.
107. Vieira CL, Cury PR, Miname MH, Martinez LR, Bortolotto LA, Giuliano IB, Santos RD, Caramelli B. Severe periodontitis is associated with diastolic blood pressure elevation in individuals with heterozygous familial hypercholesterolemia: a pilot study. *J Periodontol.* 2011 May;82(5):683-8.
108. Virally M, Blicklé JF, Girard J, Halimi S, Simon D, Guillausseau PJ. Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes Metab.* 2007 Sep;33(4):231-44. Epub 2007 Aug 20. Review.
109. Wang CH, Chueh LH, Chen SC, Feng YC, Hsiao CK, Chiang CP. Impact of diabetes mellitus, hypertension, and coronary artery disease on tooth extraction after nonsurgical endodontic treatment. *J Endod.* 2011 Jan;37(1):1-5.
110. Watanabe K, Petro BJ, Shlimon AE, Unterman TG. Effect of Periodontitis on Insulin Resistance and the Onset of Type 2 Fatty Rats. *Insulin.* 2008; 79(7).
111. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005 May;115(5):1111-9. Review.
112. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J (2011). *IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030.* *Diabetes Res Clin Pract.* Dec;94(3):311-21.
113. Yamamoto T, Tsuneishi M, Furuta M, Ekuni D, Morita M, Hirata Y. Relationship between decrease of erythrocyte count and progression of periodontal disease in a rural Japanese population. *J Periodontol.* 2011 Jan;82(1):106-13.

114. Yoshihara A, Deguchi T, Hanada N, Miyazaki H. Renal function and periodontal disease in elderly Japanese. J Periodontol. 2007 Jul; 78(7):1241-8.
115. Yoshihara A, Hayashi Y, Miyazaki H. Relationships among bone turnover, renal function and periodontal disease in elderly Japanese. J Periodontal Res. 2011 Aug;46(4):491-6.
116. Žilinskas J, Kubilius R, Žekonis G, Žekonis J. Total antioxidant capacity of venous blood, blood plasma, and serum of patients with periodontitis, and the effect of Traumeel S on these characteristics. Medicina (Kaunas). 2011a;47(4):193-9.
117. Žilinskas J, Kubilius R, Žekonis G, Žekonis J. Total antioxidant capacity of venous blood, blood plasma, and serum of patients with periodontitis, and the effect of Traumeel S on these characteristics. Medicina (Kaunas). 2011a;47(4):193-9.

Anexos

Anexo 1 – Aprovação do comitê de ética no uso de animais (CEUA).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Análise hematológica por hemograma, creatinina, triglicérides e colesterol em ratos diabéticos portadores de infecção pulpar e/ou periodontal" sob responsabilidade do Pesquisador **LUCIANO TAVARES ÂNGELO CINTRA** e colaboração de João Eduardo Gomes Filho, Aguinaldo Candido da Silva Facundo, Renata Oliveira Samuel, India Olinta de Azevedo Queiroz, Clícia Pereira Ribeiro e Francine Benetti está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **00539-2012**.

CERTIFICATE

We certify that the research "Blood analysis by hemogram, creatinine, triglycerides and cholesterol in diabetic rats with pulp disease", process number **00539-2012**, under responsibility of **LUCIANO TAVARES ÂNGELO CINTRA** and with collaboration of João Eduardo Gomes Filho, Aguinaldo Candido da Silva Facundo, Renata Oliveira Samuel, India Olinta de Azevedo Queiroz, Clícia Pereira Ribeiro and Francine Benetti agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Edilson Ervolino
CEUA Vice-Coordenador

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária - Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal - Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16.850-680 Araçatuba - SP
Tel (18) 3636-1440 Fax (18) 3636-1403 E-mail: fabiano.candido@fenva.unesp.br

Anexo 2 – Artigo publicado na revista Clinical Oral Investigation (2012): **Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats.** Cintra LT, da Silva Facundo AC, Azuma MM, Sumida DH, Astolphi RD, Bomfim SR, Narciso LG, Gomes-Filho JE. Clin Oral Investig. 2012 Oct 5.

Clin Oral Invest
DOI 10.1007/s00784-012-0853-7

ORIGINAL ARTICLE

Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats

Luciano Tavares Angelo Cintra ·
Aguinaldo Cândido da Silva Facundo ·
Mariane Maffei Azuma · Dóris Hissako Sumida ·
Rafael Dias Astolphi · Suely Regina Mogami Bomfim ·
Luís Gustavo Narciso · João Eduardo Gomes-Filho

Received: 2 June 2012 / Accepted: 25 September 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract

Objectives The aim of this study was to evaluate triglyceride and cholesterol levels in diabetic rats and their relationship with pulpal and periodontal diseases.

Methods Eighty male rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) were divided into the following eight groups comprising ten animals each: normal rats (G1), rats with pulpal diseases (G2), rats with periodontal diseases (G3), rats with both pulpal and periodontal diseases (G4), diabetic rats (G5), diabetic rats with pulpal diseases (G6), diabetic rats with periodontal diseases (G7), and diabetic rats with both periodontal and pulpal diseases (G8). Diabetes was induced by injecting streptozotocin, periapical lesions were induced by exposing pulpal tissue to the oral environment, and periodontal diseases were induced by periodontal ligature. The animals were killed after 30 days, and lipid profile was enzymatically measured using Trinder's method. The total assessed values were statistically analyzed by analysis of variance and Tukey test ($p < 0.05$).

Results The triglyceride levels of diabetic rats with periodontal disease and of diabetic rats with both periodontal and pulpal diseases were significantly higher than those of normal rats and nondiabetic group rats, respectively. The differences in the cholesterol levels among the groups were not significant.

Conclusions We found that the association of pulpal and periodontal diseases with diabetes increased triglyceride levels in rats.

Clinical significance Changes in lipid profile may be related to the presence of oral infections and diabetes.

Key words Lipid profile · Oral infections · Diabetes · Triglyceride levels · Cholesterol levels

Introduction

Previous studies have shown that patients with periodontal diseases have higher total cholesterol and triglyceride levels than individuals with good oral hygiene [1–3]. Endodontic infections are very common oral infections worldwide, with an incidence similar to that of periodontal disease [4]. In addition, the occurrence of diabetes affects the severity of endodontic and periodontal infections [4–6] and may be associated with hyperlipidemia [7].

In recent years, various studies have shown that localized inflammation in the oral cavity is associated with increased levels of systemic disease markers [5, 8, 9]. These studies especially focused on the relationship between periodontal diseases, diabetes [8, 9], and cardiovascular diseases [10–12]. Several studies have shown that individuals with high blood pressure, obesity, and high plasma triglyceride and cholesterol

L. T. A. Cintra (✉) · A. C. da Silva Facundo · M. M. Azuma ·
J. E. Gomes-Filho
Endodontics, Araçatuba Dental School,
UNESP-Univ Estadual Paulista,
R. José Bonifácio,
Araçatuba 1193 São Paulo, Brazil
e-mail: lucianocintra@foa.unesp.br

D. H. Sumida · R. D. Astolphi
Basic Science, Araçatuba Dental School,
UNESP-Univ Estadual Paulista,
Araçatuba, São Paulo, Brazil

S. R. M. Bomfim · L. G. Narciso
Clinic and Surgery and Animal Reproduction, Araçatuba
Veterinary Medicine School, UNESP-Univ Estadual Paulista,
Araçatuba, São Paulo, Brazil

Published online: 05 October 2012

 Springer

Table 1 Groups formed according to the experimental procedures

		Oral diseases			
		No oral diseases	Pulpal infections	Periodontal infections	Pulpal and periodontal infections
Systemic condition	Healthy rats	G1	G2	G3	G4
	Diabetic rats	G5	G6	G7	G8

levels have increased risk of developing diabetes [13] and coronary heart diseases [14, 15].

One study reported that patients with periodontitis had dyslipidemia and higher non-fasting serum glucose levels than the control population, suggesting a possible link between periodontitis, systemic inflammation, and a dysmetabolic state in otherwise healthy individuals [12]. Another study reported that a patient with pulpal infection showed sudden glucose intolerance and a rapidly increasing requirement for insulin [16]. However, no study about the interrelationship between pulpal infection and hyperlipidemia is available in the literature.

Studies have indicated that periodontal diseases, which cause an increase in the levels of proinflammatory cytokines in the serum and gingival crevicular fluid, are not only associated with the severity of lipid metabolism deterioration but also with worsening of the hyperlipidemic state of patients [17]. Furthermore, many studies have shown that pulpal infection is associated with increased proinflammatory cytokine levels [18, 19]. However, no studies are available on the interrelationship between the cytokine levels and lipid levels during pulpal infections.

Some studies have shown that the occurrence of periodontal diseases alone causes a change in the serum triglyceride or cholesterol levels [1–3]. In another study, patients who developed periodontal diseases also showed an increase in their cholesterol levels [20]. Furthermore, with the treatment of periodontal diseases, the levels of all the

lipid parameters decreased; however, only the decrease in serum levels of total cholesterol was found to be statistically significant [17]. No studies have investigated the lipid profile patterns in animals or humans in relation with pulpal diseases and the association of these patterns with periodontal diseases and diabetes. The aim of this study was to evaluate the triglyceride and cholesterol levels in diabetic rats and their relationship with pulpal and periodontal diseases.

Methods

Eighty male *Rattus norvegicus albinus*, Wistar, each weighing 250–280 g, were used in the study. The animals were housed in temperature-controlled rooms and were given ad libitum access to water and food. The experimental protocol was approved by and conducted in accordance with the guidelines of the institutional ethical committee.

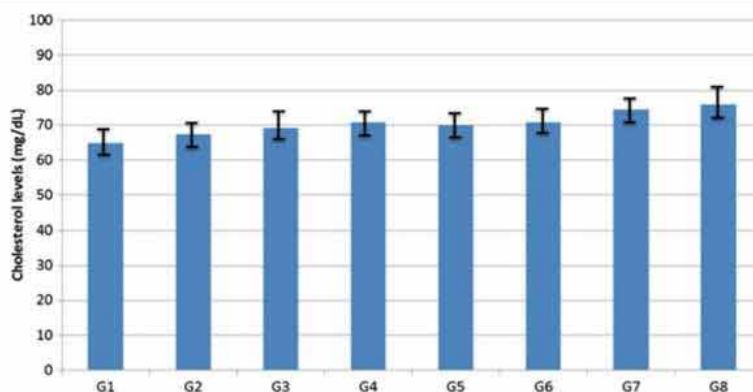
The rats were fasted overnight (14–16 h), and tail-tip blood was used to measure the fasting blood glucose levels with an automatic blood glucose monitoring system (Accu-Check® Performa; Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA). Subsequently, the rats were intramuscularly anesthetized with ketamine (87 mg/kg; Francotar; Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda., Roseira, Brazil) and xylazine (13 mg/kg; Rompun; Bayer S. A., São Paulo, Brazil). The rats were randomly assigned into groups and were endovenously injected in the penile vein with either citrate buffer solution

Table 2 Mean and standard deviation (mean ± SD) values of the lipid profile of the rats from the eight groups

Groups	Blood glucose levels (mg/dL)		Lipid profile			
			Cholesterol levels (mg/dL)		Triglyceride levels (mg/dL)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
G1	99.87 a	12.90	64.80 a	12.91	53.11 a	12.32
G2	102.19 a	17.34	67.40 a	12.50	57.66 a, b	11.16
G3	100.78 a	10.52	69.16 a	11.42	58.77 a, b	21.97
G4	97.65 a	18.67	70.80 a	10.56	60.44 a, b	16.10
G5	304.46 b	43.91	69.85 a	11.90	86.44 a, b, c	26.63
G6	299.13 b	39.77	70.87 a	8.45	90.42 a, b, c	25.82
G7	326.95 b	47.90	74.42 a	9.60	107.50 b, c	28.13
G8	361.64 b	53.23	75.83 a	13.41	129.00 c	26.77

Same letters indicate the absence of statistical difference among the groups ($p > 0.05$)

Fig. 1 Mean and standard deviation (mean $\pm$ SD) values of blood cholesterol levels (in milligrams per deciliter) of the rats from the eight groups



(0.01 M, pH 4.5; groups 1–4, $n=40$) or with streptozotocin (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Streptozotocin was dissolved in citrate buffer solution at 35 mg/kg body weight for experimental induction of diabetes (groups 5–8, $n=40$) [21].

Six days after diabetes was induced, blood samples were collected from each animal to determine their blood glucose levels. The rats with blood glucose levels of more than 200 mg/dL were used in the study [22]. After confirmation of hyperglycemia, animals were sedated for the induction of oral infection.

For the development of pulpal infection, the pulps of the right upper first molars were exposed on the mesial surface using surgical round burs (Broca Ln Long Neck- Maillefer, Dentsply Ind. e Com. Ltda, Petrópolis, Brazil) (groups 2, 4, 6, and 8). To induce periodontal disease in rats from groups 3, 4, 7, and 8, sterile 4/0 silk ligatures (Ethicon; Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brazil) were placed around the second maxillary molar on the left [23]. After the infections were induced, the rats were divided into the groups as shown in Table 1.

After 30 days, the animals were killed with an overdose of the anesthetic solution. To determine the serum lipid profile, venous blood samples (50 μ l) were collected via a cardiac puncture after the rats had fasted overnight for 8–12 h. The

blood samples were centrifuged immediately after collection at $1,800\times g$ for 15 min at 4 °C to obtain plasma [24].

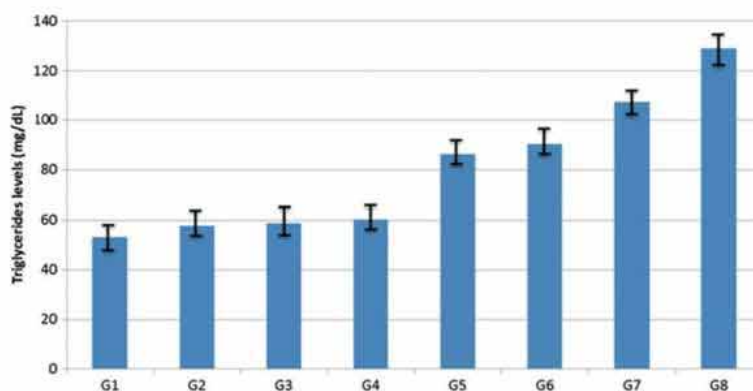
Plasma total cholesterol and triglyceride levels were measured enzymatically by using a commercial kit (Cholesterol Liquiform Labtest® and Triglicérides Liquiform Labtest®, respectively—Labtest Diagnóstica Ind. e Com. Ltda, Lagoa Santa, MG, Brazil) as described by Trinder [25].

The total assessed values were tabulated for each experimental group, and a single calibrated operator analyzed the data in a blinded manner. One-way analysis of variance and the Tukey's test were used for statistical analysis, and a significance level of 5 % ($p<0.05$) was used to compare the mean values.

Results

Diabetic rats had significantly higher blood glucose levels than the control rats, indicating the development of hyperglycemia (Table 2). The changes in the plasma lipid concentration of the nondiabetic and diabetic rats are shown in Table 2. Total cholesterol levels were similar in the rats of all the groups (Fig. 1). No statistically significant differences were observed in the cholesterol levels of any groups ($p=0.426$). The

Fig. 2 Mean and standard deviation (mean $\pm$ SD) values of blood triglycerides levels (in milligrams per deciliter) of the rats from the eight groups



baseline cholesterol levels were higher in the rats in the diabetic groups than in the rats from the nondiabetic groups, but the differences in the levels were not significant (Table 2).

The total triglyceride levels were similar in the rats of all the nondiabetic groups ($p>0.05$). However, the rats in groups 1–4 had lower triglyceride levels than those in groups 5–8 (Fig. 2). The rats in groups 5–8 had the highest triglyceride levels. The triglyceride levels of diabetic rats with periodontal disease (G7) and of diabetic rats with periodontal and pulpal diseases (G8) were significantly higher than those of normal rats (G1) ($p=0.000$) and nondiabetic group rats (G1–G4) ($p=0.000$), respectively.

Discussion

The animals used in this study had uniform body weights, were normoglycemic, and did not have glycosuria. Diabetes mellitus was induced by injecting the rats with streptozotocin. The glucose levels were found to be approximately fourfold higher than those observed in the normal nondiabetic animals. Diabetic rats showed intense thirst, polyuria, and apathy. The overall metabolism of rats with streptozotocin-induced diabetes is very similar to the metabolism of human diabetic patients [21]. The blood glucose levels were higher in the rats of the diabetic model group than in those of the normal control group, indicating that hyperglycemia persisted in the diabetic rats.

Two models of oral infection were used [22, 23]. A previous study reported maximal active lesion expansion and bone destruction between days 7 and 15 after pulp exposure in a rat model system in which periapical lesions had been induced [21]. In the present study, periapical lesions were induced by pulpal exposure and were confirmed radiographically.

The process of inducing periodontal diseases by ligature placement is widely used in animal studies [23, 26]. Ligature favors the formation of bacterial plaques and induces an inflammatory response, thereby replicating many aspects of periodontal diseases in humans [23].

Oral infections, diabetes, and hypercholesterolemia have been closely associated with cardiovascular diseases [11, 27, 28]. Hypercholesterolemia induces pathologic manifestations such as decreased myocardial capillary density and increased endothelial damage [29]. Patients who develop periodontal disease show increased total cholesterol levels, low-density lipoproteins, and triglycerides levels [20, 30]. The results of some studies have shown that treatment of periodontal disease decreases the levels of all the lipid parameters; however, only the decrease in total cholesterol levels [7, 17] or oxidized low-density lipoprotein [31] was found to be statistically significant in the human model.

The results of some studies have indicated hypercholesterolemia in diabetic rats, which indicates the development of dyslipidemia in these rats [1–3]. In the present study,

despite a small increase in the total cholesterol levels in diabetic rats with pulpal and periodontal diseases, the values were not found to be statistically significant.

Our results suggest that diabetes, pulpal infections, and periodontal lesions are correlated with higher levels of triglycerides, but a previous study has shown that high triglyceride levels are not correlated with the severity of attachment loss in patients with periodontitis [10]. Various studies have shown high triglyceride levels in diabetic rats, diabetic patients, and experimental periodontitis models [2, 3]. We suggest that the increased triglyceride levels observed in the diabetic rats in our study may be due to the lack of insulin, which normally activates the enzyme lipoprotein lipase [2, 3].

Although the impact of diabetes on periodontal diseases and periapical healing has been investigated previously, very few studies have reported the influence of pulpal infections alone or in association with periodontal diseases on blood cholesterol and triglyceride levels. The results of our study showed that the association of pulpal with periodontal diseases increases triglyceride levels in diabetic rats. Further studies are required for evaluating the interrelationship between diabetes, pulpal infections, and lipid levels and for confirming whether endodontic infections influence systemic health.

Acknowledgments The authors deny any conflicts of interest related to this study. This study was supported by PROPE/UNESP (005/2011)

References

1. Majithiya JB, Balaraman R, Giridhar R, Yadav MR (2005) Effect of bis[curcumino]oxovanadium complex on non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Trace Elem Med Bio* 18:211–217
2. Tunalı S, Yanardag R (2006) Effect of vanadyl sulfate on the status of lipid parameters and on stomach and spleen tissues of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol* 53:271–277
3. El-Sayyad HI, Al-Haggar MS, El-Ghawet HA, Bakr IH (2012) Cardiomyopathy and angiogenesis defects of Wistar rat fetuses of diabetic and hypercholesterolemic mothers. *Nutrition* 28:7–8
4. Peters LB, Lindeboom JA, Elst ME, Wesselink PR (2011) Prevalence of apical periodontitis relative to endodontic treatment in an adult Dutch population: a repeated cross-sectional study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 111:523–528
5. Fouad AF (2003) Diabetes mellitus as a modulating factor of endodontic infections. *J Dent Educ* 67:459–467
6. Lakschevitz F, Aboodi G, Tenenbaum H, Glogauer M (2011) Diabetes and periodontal diseases: interplay and links. *Curr Diabetes Rev* 7:433–439
7. Taleghani F, Shamaei M, Shamaei M (2010) Association between chronic periodontitis and serum lipid levels. *Acta Med Iran* 48:47–50
8. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, Taylor R (2012) Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia* 55:21–31
9. Susanto H, Nesse W, Dijkstra PU, Hoedemaker E, van Reenen YH, Agustina D, Vissink A, Abbas F (2011) Periodontal inflamed surface area and C-reactive protein as predictors of HbA1c: a study in Indonesia. *Clin Oral Invest* 16:1237–1242

10. Sridhar R, Byakod G, Pudukalkatti P, Patil R (2009) A study to evaluate the relationship between periodontitis, cardiovascular disease and serum lipid levels. *Int J Dent Hyg* 7:144–150
11. Albandar JM (2000) Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol* 29:177–206
12. Nibali L, D'Aiuto F, Griffiths G, Patel K, Suvan J, Tonetti MS (2007) Severe periodontitis is associated with systemic inflammation and a dysmetabolic status: a case-control study. *J Clin Periodontol* 34:931–937
13. Fernández-Real JM, Ricart W (2003) Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 24:278–301
14. Besterman W, Houston MC, Basile J, Egan B, Ferrario CM, Lackland D, Hawkins RG, Reed J, Rogers P, Wise D, Moore MA (2005) Addressing the global cardiovascular risk of hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus, and the metabolic syndrome in the southeastern United States, part II: treatment recommendations for management of the global cardiovascular risk of hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus, and the metabolic syndrome. *Am J Med Sci* 329:292–305
15. Atar IA, Atar I, Aydınalp A, Ertan C, Bozbaş H, Ozin B, Yıldırım A, Müderrisoğlu H (2011) Is there any relationship between coronary artery disease and postprandial triglyceride levels? *Anadolu Kardiyol Derg* 11:201–206
16. Schulze A, Schönauer M, Busse M (2007) Sudden improvement of insulin sensitivity related to an endodontic treatment. *J Periodontol* 78:2380–2384
17. Fetoğlu Ö, Koroğlu BK, Hıçılmaz H, Sert T, Özden M, Sütçü R, Tamer MN, Orhan H, Ay ZY, Öztürk Tonguç M, Kızıoğlu FY (2011) Pro-inflammatory cytokine levels in association between periodontal disease and hyperlipidaemia. *J Clin Periodontol* 38:8–16
18. Marçal JR, Samuel RO, Fernandes D, de Araujo MS, Napimoga MH, Pereira SA, Clemente-Napimoga JT, Alves PM, Mattar R, Rodrigues V Jr, Rodrigues DB (2010) T helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod* 36:995–999
19. Teixeira-Salum TB, Rodrigues DB, Gervásio AM, Souza CJ, Rodrigues V Jr, Loyola AM (2010) Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med* 39:250–256
20. Yamamoto T, Tsuneishi M, Furuta M, Ekuni D, Morita M, Hirata Y (2011) Relationship between decrease of erythrocyte count and progression of periodontal disease in a rural Japanese population. *J Periodontol* 82:106–113
21. Kohsaka T, Kumazawa M, Yamasaki M, Nakamura H (1996) Periapical lesions in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Endod* 22:418–421
22. Garber SE, Shabahang S, Escher AP, Torabinejad M (2009) The effect of hyperglycemia on pulpal healing in rats. *J Endod* 35:60–62
23. Holzhausen M, Rossa Júnior C, Marcantonio Júnior E, Nassar PO, Spolidório DM, Spolidório LC (2002) Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol* 73:1030–1036
24. Finamor IA, Saccol EM, Gabriel D, Ourique GM, Riffel AP, Konrad SP, Belló-Klein A, Partata W, Baldisserotto B, Llesuy SF, Pavanato MA (2012) Effects of parboiled rice diet on oxidative stress parameters in kidney of rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Med Food* 15:598–604
25. Trinder P (1969) Quantitative determination of triglycerides using GPO-PAP method. *Annals of Clinical Biochemistry* 6:2427
26. Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, Sara de Lima Coutinho M, Ervolino E, Saliha Garbin CA, Machado UF, Sumida DH (2011) Periodontal disease decreases insulin sensitivity and insulin signaling. *J Periodontol* 83:864–870
27. Mattila KJ, Pussinen PJ, Paju S (2005) Dental infections and cardiovascular diseases: a review. *J Periodontol* 76:2085–2088
28. Boodhwani M, Sellke FW (2009) Therapeutic angiogenesis in diabetes and hypercholesterolemia: influence of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 11:1945–1959
29. Stapleton PA, Goodwill AG, James ME, Brock RW, Frisbee JC (2010) Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies. *J Inflamm* 18:7–54
30. Katz J, Flugelman MY, Goldberg A, Heft M (2007) Association between periodontal pockets and elevated cholesterol and low density lipoprotein cholesterol levels. *J Periodontol* 73:494–500
31. Tamaki N, Tomofuji T, Ekuni D, Yamanaka R, Morita M (2011) Periodontal treatment decreases plasma oxidized LDL level and oxidative stress. *Clin Oral Invest* 15:953–958

Anexo 3 – Instruções para realização do hemograma utilizando o analisador automático ABX (ABX Micros ABC Vet - Horiba ABX Diagnostics, Montpellier, France).

O aparelho ABX Micros ABC Vet é um analisador automático de uso veterinário. Fornece todos os resultados de um hemograma completo para as seguintes espécies de animais: cão, gato, ruminantes, equinos, coelho, roedores e ovinos. A seleção da espécie é feita por meio de um cartão com chip pré-programado para cada espécie que deve ser inserido no aparelho. Além do slot para cartão, o aparelho consta com uma cânula para aspirar a amostra, um visor digital para visualização dos resultados, uma porta para impressora externa e um slot lateral para acoplar o kit de reagentes.

Método de utilização do ABX Micros ABC Vet:

- Ligar o aparelho e os componentes externos (impressora se houver)
- Verificar se há reagentes o suficiente para processar a amostra
- Inserir o cartão próprio para a espécie de animal a ser analisada e apertar a tecla de identificação (ID)
- A alíquota da amostra deve estar acondicionada em ependorf e caso tenha sido congelada, deve-se esperar que ela retorne ao estado líquido
- Posicionar o ependorf de forma que a cânula do aparelho toque o fundo do recipiente e aperte a tecla Start
- O aparelho irá aspirar a quantidade de 20 μ L da amostra e o processamento leva cerca de 2 minutos
- Após o processamento o aparelho fornece os resultados no próprio visor e o resultado pode ser impresso, caso haja uma impressora conectada
- O aparelho então realizará o processo de limpeza dos componentes e estará pronto para uma nova análise ou para ser desligado



Analisador automático ABX (ABX Micros ABC Vet - Horiba ABX Diagnostics, Montpellier, France).

Anexo 4 – Instruções para realização das dosagens de creatinina, colesterol e triglicérides utilizando o analisador semi-automático Celm SB-190 e kits comerciais Labtest.

1. Creatinina

A dosagem de creatinina foi realizada com utilização do aparelho Celm SB-190 (CELM Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos. Barueri – São Paulo) e o kit comercial para dosagem de Creatinina K Labtest (Creatinina K Labtest® ref. 96). O aparelho Celm SB-190 é um sistema semi-automático para reações de ponto-final e cinéticas. Possui um painel digital para seleção do tipo de análise, uma cânula para aspirar a amostra e uma impressora interna. O kit Labtest para dosagem de creatinina é composto por dois reagentes (reagente 1 e reagente 2) que devem ser misturados apenas no momento da análise. A dosagem é feita utilizando o soro sanguíneo, que deve ser previamente separado com centrifugação de 10 minutos a 3.000 rpm e reservado para análise.

Método para dosagem de creatinina utilizando o aparelho Celm SB-190 e o kit Creatinina K Labtest:

- Pipetar 800 µL do reagente 1 em um tubo de ensaio de vidro;
- Pipetar 200 µL do reagente 2 no mesmo tubo onde foi pipetado o primeiro reagente;
- Pipetar 100 µL da amostra no tubo contendo os reagentes;
- Selecionar no aparelho a opção para dosagem de creatinina;
- Posicionar o tubo no aparelho de forma que a cânula toque o fundo do tubo;
- O aparelho irá aspirar o conteúdo do tubo e realizará a leitura;
- A análise demora alguns minutos, pois são realizadas leituras em períodos iniciais curtos ao tempo que acontece a reação química entre a amostra e os reagentes (método de Jaffé modificado);
- Após o processamento o resultado é impresso;
- Ao término da análise os componente do aparelho devem ser limpos. Para tanto basta selecionar a opção de limpeza e deixar que a cânula aspire água destilada. O

aparelho está pronto para uma nova análise ou para ser desligado.

2. Colesterol

A dosagem de colesterol também utiliza o aparelho Celm SB-190 e o soro sanguíneo, ambos descritos anteriormente. O kit utilizado é o Colesterol Liquiform Labtest (Colesterol Liquiform Labtest® ref. 76) composto por apenas um reagente.

Método para dosagem de colesterol utilizando o aparelho Celm SB-190 e o kit Colesterol Liquiform Labtest:

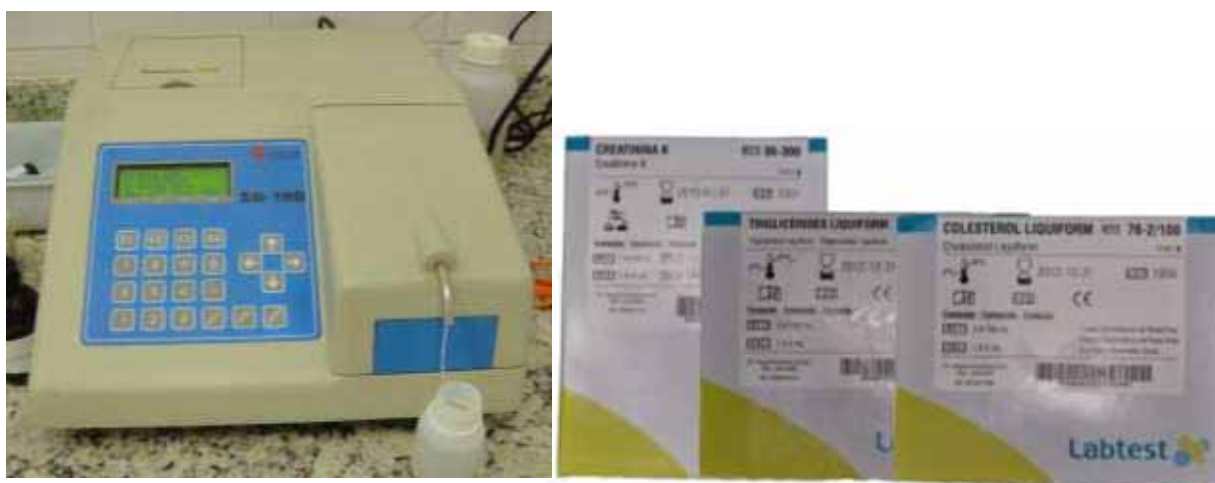
- Pipetar 1 mL do reagente em um tubo de ensaio de vidro;
- Pipetar 10 µL da amostra no tubo contendo o reagente;
- Levar o tubo contendo a amostra + reagente para uma cuba em banho maria por 10 minutos a 37°;
- Selecionar no aparelho a opção para dosagem de colesterol;
- Posicionar o tubo no aparelho de forma que a cânula toque o fundo do tubo;
- O aparelho irá aspirar o conteúdo do tubo e realizará a leitura;
- A análise demora alguns segundos, e após o processamento o resultado é impresso;
- Ao término da análise os componente do aparelho devem ser limpos. Para tanto basta selecionar a opção de limpeza e deixar que a cânula aspire água destilada. O aparelho está pronto para uma nova análise ou para ser desligado.

3. Triglicérides

A dosagem de triglicérides é feita com o kit Triglicérides Liquiform Labtest (Triglicérides Liquiform Labtest® ref. 87) e segue os mesmos passos utilizados na dosagem de colesterol, mudando apenas a configuração do aparelho.

Método para dosagem de triglicérides utilizando o aparelho Celm SB-190 e o kit Triglicérides Liquiform Labtest:

- Pipetar 1 mL do reagente em um tubo de ensaio de vidro;
- Pipetar 10 μ L da amostra no tubo contendo o reagente;
- Levar o tubo contendo a amostra + reagente para uma cuba em banho maria por 10 minutos a 37°;
- Selecionar no aparelho a opção para dosagem de triglicérides;
- Posicionar o tubo no aparelho de forma que a cânula toque o fundo do tubo;
- O aparelho irá aspirar o conteúdo do tubo e realizará a leitura;
- A análise demora alguns segundos, e após o processamento o resultado é impresso;
- Ao término da análise os componente do aparelho devem ser limpos. Para tanto basta selecionar a opção de limpeza e deixar que a cânula aspire água destilada. O aparelho está pronto para uma nova análise ou para ser desligado.



Aparelho Celm SB-190 (CELM Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos. Barueri – São Paulo) e Kits comerciais Labtest (Creatinina K Labtest[®] ref. 96, Triglicérides Liquiform Labtest[®] ref. 87 e Colesterol Liquiform Labtest[®] ref. 76, respectivamente - Labtest Diagnóstica Ind. e Com. Ltda, Lagoa Santa, MG, Brazil).