



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba

GUSTAV GUIMARÃES

TESE DE DOUTORADO

**INFLUÊNCIA DA EXTENSÃO DA DOENÇA PERIODONTAL NO
PERFIL SANGUÍNEO DE RATOS WISTAR**

Araçatuba – SP

2016

GUSTAV GUIMARÃES

**INFLUÊNCIA DA EXTENSÃO DA DOENÇA PERIODONTAL NO
PERFIL SANGUÍNEO DE RATOS WISTAR**

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

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

Araçatuba - SP

2016

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

G963i Guimaraes, Gustav.
Influência da extensão da doença periodontal no perfil
sanguíneo de ratos Wistar / Gustav Guimaraes. - Araçatuba,
2016
48 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra

1. Doenças periodontais 2. Contagem de células sanguíneas
3. Creatinina 4. Células sanguíneas I. T.

Black D15
CDD 617.695

DEDICATÓRIA

Meu Pai, Cláudio Reginaldo Guimarães, meu primo, onde sua retidão é motivo de orgulho. Nunca deixou que a distância se tornasse motivo para que nos afastássemos, seu apoio a esta jornada foi fundamental. Sua paciência e tolerância são admiráveis, um exemplo de vida, obrigado por me ajudar a desbastar minhas arestas.

À minha mãe, Marisa, minha guerreria, sua maneira de enfrentar as dificuldades com obstinação é um exemplo, obrigado por suas cobranças com minhas notas escolares e minhas condutas, com toda certeza foram fundamentais para que me tornasse uma pessoa melhor.

À minha esposa, Maria Rosa, meu mundo, além de esposa é amiga, companheira, colega de profissão e principalmente minha parceira nos meus sonhos e nas minhas conquistas, obrigado por mais uma vez por fazer parte desta conquista.

À minha filha, Ana Vitória, fonte de inspiração e apoio, desde cedo aprendeu a entender às ausências, mas sempre apoiou e incentivou nos momentos mais difíceis as dificuldades impostas nesta jornada.

Aos meus irmãos, Giuliano, Tatiana e Cláudio, todos, com qualidades únicas e diferentes maneiras de enfrentar os problemas, obrigado por tudo.

À minha madrinha e segunda mãe Clóris, sempre carinhosa e querida que nos deixou durante esta minha jornada e hoje está no oriente eterno ao lado do nosso PAI CELESTIAL compartilhando este momento.

Ao meu primo, cunhado e amigo, Renato, que cumpriu sua jornada terrena de forma bastante precoce e está no oriente eterno junto ao nosso PAI CELESTIAL, obrigado pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos na infância e adolescência.

AGRADECIMIENTOS

PAI CELESTIAL

*Obrigado, por ser tão generoso em nos dar
a liberdade de escolher o que plantar e
mais ainda em ser tão justo em colher
exatamente o que plantamos.*

AGRADEÇO

À Direção da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do seu diretor professor Dr. Wilson Roberto Poi.

À Direção do Centro Universitário São Lucas, UNISL, de Porto Velho, Rondônia, na pessoa da Magnífica reitora Prof^a. Maria Eliza.

À equipe de coordenação do programa de pós-graduação em Ciência Odontológica – DINTER- da Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

A todos os docentes Juliano, Alberto, Débora, Denise, Célio, Robson e Mirela do programa de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP que contribuíram com seus conhecimentos, experiências na área de ensino, pesquisa e acreditaram no programa DINTER.

Ao querido amigo e professor José Peixoto Ferrão e Mario Umezawa que participaram da minha formação profissional no 1º curso de especialização de Periodontia em Porto Velho- RO.

A professora Sheila Cavalca Cortelli minha querida orientadora de mestrado que junto com sua equipe de periodontia da UNITAU-SP, proporcionou segurança e sabedoria nos meus primeiros passos na área de ensino e pesquisa.

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

AGRADEÇO AOS AMIGOS

Aos queridos amigos Júnior e Lucinei pela amizade sincera, pela torcida e pelo carinho que sempre demonstraram durante esta jornada.

Aos amigos e irmãos Sergio, Wilson, Jean, Marcos Donizete e Tiago pelos momentos de alegria, torcida e por terem tido paciência em ouvir a palavra “doutorado” em nossas conversas, durante estes 3 anos.

Aos amigos Thiago e Lorenza, pelos encontros maravilhosos, pelas palavras de carinho, e pela excelente companhia sempre acompanhado de um bom vinho.

A amiga e colega Simone, pelas palavras de apoio e incentivo, sempre pronta a sorrir mesmo em momentos difíceis.

A Helena, meu braço direito, acompanha desde o mestrado esta minha trajetória, sempre com muita paciência e dedicação e também a Cleide, Gilmar, Regiane e Daiane pela convivência harmoniosa no nosso trabalho.

Aos professores Paulo, Andrea, Caren e Leslie pelas substituições nas aulas durante minha ausência na realização do doutorado.

Aos amigos de pós-graduação, de Porto Velho, do programa DINTER Isabel, Rui, Paulo, Ranier, Jaime, Kátia, Luna, Dino, Ana Gisele e Maria Rosa pela amizade, companheirismo e colaboração.

Aos colegas de pós-graduação de Araçatuba Diego, Francine, Carlos, Ana Maria, Renata, Índia e Vanessa pelo apoio e ajuda nos trabalhos experimentais e especialmente Mariane Azuma pelo seu carinho e atenção.

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

AGRADEÇO ESPECIALMENTE

Ao meu orientador, irmão e professor Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra, obrigado por ter aceitado este desafio desta orientação, aprendi muito apesar da pouca convivência direta devido a distância, aprendi mais do que técnicas e conhecimento teórico, aprendi como ser responsável, disciplinado e educado. Obrigado, por ser sempre acessível, e principalmente por entender as minhas limitações. O orientador tem um papel muito importante na formação acadêmica, mas não menos importante na formação pessoal do seu orientado, pois será responsável pela formação de um futuro orientador.

GUIMARÃES, G. Influência da extensão da doença periodontal no perfil sanguíneo de ratos Wistar 2016. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência da extensão da doença periodontal no perfil sanguíneo de ratos Wistar. Foram utilizados 30 ratos divididos em 3 grupos de 10 animais: C- ratos controle; DP1- ratos com doença periodontal em 3 molares superiores; DP2 – ratos com doença periodontal em 3 molares superiores e 3 inferiores. A doença periodontal foi induzida por meio da confecção de ligadura em torno do colo dentário dos molares selecionados de acordo com cada grupo. Após 30 dias, os animais foram anestesiados e, por meio de uma punção cardíaca, foi coletado 5ml de sangue para as análises dos parâmetros do hemograma, creatinina, triglicérides e colesterol. Em seguida, os animais foram sacrificados e as maxilas removidas e processadas para análise histopatológica em coloração de H.E. para caracterizar o perfil da doença periodontal em cada animal. Os resultados obtidos a partir do tecido hematológico foram analisados estaticamente por meio dos testes de ANOVA e Tukey, com nível de significância de 5%. Pode-se observar nos grupos DP1 e DP2 presença de infiltrado inflamatório crônico, perda de inserção conjuntiva, perda de estrutura óssea cortical e alveolar, presença de reabsorções dentárias, presença de biofilme e sequestro ósseo. Quanto ao perfil sanguíneo, pode-se observar diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os grupos DP1 e DP2 em relação à quantidade de leucócitos e linfócitos ($p < 0,05$). Ainda, o grupo DP2 apresentou maior quantidade de leucócitos e neutrófilos em relação ao grupo DP1 e controle ($p < 0,05$). Pode-se concluir que a presença da doença periodontal eleva a quantidade de leucócitos, neutrófilo e linfócitos no sangue de ratos Wistar, e que, a extensão da doença periodontal influencia na quantidade de leucócitos e neutrófilos.

Palavra Chaves: Doença Periodontal, Hemograma, Creatinina, Células sanguíneas

GUIMARÃES, G. Influence of the periodontal disease extension on blood profile of Wistar rats 2016. Doctoral thesis – Araçatuba Dental School, UNESP – Univ Estadual Paulista. Araçatuba, 2016.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of the periodontal disease extension on the blood profile of Wistar rats. Thirty rats were divided into 3 groups of 10 animals each: C control rats; DP1- rats with periodontal disease in 3 upper molars; DP2 - rats with periodontal disease in 3 upper and 3 lower molars. Periodontal disease was induced by ligature around the tooth according to each group. After 30 days, the animals were killed and 5ml of blood was collected for analyzes of blood count parameters, creatinine, triglycerides and cholesterol. Then the animals were sacrificed and the jaws removed and processed for histopathological analysis to characterize, in H.E. staining, the profile of periodontal disease in each animal. The results from the hematologic tissue were analyzed statistically by ANOVA and Tukey test, with 5% significance level. It can be observed in groups DP1 and DP2 presence of chronic inflammatory infiltrates, connective tissue attachment loss and alveolar bone cortical structure loss, presence of resorptions, presence of biofilm and bone sequestration. As for the blood profile, it is can observe a statistically significant difference between the control group and the groups DP1 and DP2 to the amount of leukocytes and lymphocytes ($p < 0.05$). Further, DP2 group had a higher amount of leukocytes and neutrophils compared to DP1 and control group ($p < 0.05$). It can be concluded that the presence of periodontal disease increases the amount of leukocytes, neutrophils, and lymphocytes in the blood of Wistar rats, and the extent of periodontal disease affects the quantification of leukocytes and neutrophils.

Key Words: Periodontal Diseases, Blood Cell Count , Creatinine, Blood Cells

SUMÁRIO

I	INTRODUÇÃO	14
---	------------	----

II	ARTIGO	16
----	--------	----

III	REFERENCIAS	30
-----	-------------	----

IV	ANEXOS	39
----	--------	----

I NTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) caracteriza-se por todas as condições patológicas que acometem as estruturas do periodonto de proteção e/ou sustentação (Novak 2002). A DP tem sido reconhecida como um fator de risco para determinadas doenças sistêmicas, tais como Diabetes (Cintra et al. 2014a), hipertensão (Rebello et al. 2016), infarto agudo do miocárdio (Sidhu 2016), artrite (Chukkapalli et al. 2016), aterosclerose (Zeng et al. 2016), síndrome coronária aguda (Widén et al. 2016), doença renal crônica (Sharma et al 2016), obesidade (Bullon et al., 2014), parto prematuro e/ou de baixo peso ao nascer (Pozo et al. 2016), doença pulmonar obstrutiva crônica (Chung et al., 2016), depressão (Kumar et al. 2015), doença de Alzheimer (Ide et al. 2016), estresse (Atri et al. 2015), menopausa (Genco 2013), dentre outras (Scannapieco & Cantos 2000).

A relação bidirecional das infecções orais com as manifestações sistêmicas está sendo comprovada e diversos fatores podem influenciar nesta relação. Particularmente em relação à DP, considera-se que gravidade da doença, assim como a extensão da estrutura periodontal atingida, podem exercer efeitos mais significativos na condição sistêmica (Nibali et al. 2015).

As células sanguíneas têm um papel vital no fornecimento de oxigênio, mantendo hemostasia, e fornecendo proteção para os tecidos periodontais.

Existe um interesse sobre as formas em que as doenças periodontais podem ser responsáveis pelas alterações nas mudanças dos componentes celulares e moleculares do tecido sanguíneo (Loss 2005), e sobretudo com relação a extensão da doença periodontal e seu impacto sistêmico.

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a influência da extensão da doença periodontal sobre o perfil sanguíneo de ratos Wistar, por meio das análises dos parâmetros do hemograma: Hematócrito, Hemoglobina, Hemácias, Plaquetas, CHCM, Leucócitos, Neutrófilos, Linfócitos Monócitos, Eosinófilos, VCM, Creatinina, Colesterol, Triglicérides.

II ARTIGO

Influência da extensão da doença periodontal no perfil sanguíneo de ratos Wistar

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência da extensão da doença periodontal no perfil sanguíneo de ratos Wistar. Foram utilizados 30 ratos divididos em 3 grupos de 10 animais: C- ratos controle; DP1- ratos com doença periodontal em 3 molares superiores; DP2 – ratos com doença periodontal em 3 molares superiores e 3 inferiores. A doença periodontal foi induzida por meio da confecção de ligadura em torno do colo dentário dos molares selecionados de acordo com cada grupo. Após 30 dias, os animais foram anestesiados e, por meio de uma punção cardíaca, foi coletado 5ml de sangue para as análises dos parâmetros do hemograma, creatinina, triglicérides e colesterol. Em seguida, os animais foram sacrificados e as maxilas removidas e processadas para análise histopatológica em coloração de H.E. para caracterizar o perfil da doença periodontal em cada animal. Os resultados obtidos a partir do tecido hematológico foram analisados estaticamente por meio dos testes de ANOVA e Tukey, com nível de significância de 5%. Pode-se observar nos grupos DP1 e DP2 presença de infiltrado inflamatório crônico, perda de inserção conjuntiva, perda de estrutura óssea cortical e alveolar, presença de reabsorções dentárias, presença de biofilme e sequestro ósseo. Quanto ao perfil sanguíneo, pode-se observar diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os grupos DP1 e DP2 em relação à quantidade de leucócitos e linfócitos ($p < 0,05$). Ainda, o grupo DP2 apresentou maior quantidade de leucócitos e neutrófilos em relação ao grupo DP1 e controle ($p < 0,05$). Pode-se concluir que a presença da doença periodontal eleva a quantidade de leucócitos, neutrófilo e linfócitos no sangue de ratos Wistar, e que, a extensão da doença periodontal influencia na quantidade de leucócitos e neutrófilos.

Palavra Chaves: Doença Periodontal, Contagem de células sanguíneas, Creatinina, Células sanguíneas.

Influence of the periodontal disease extension on blood profile of Wistar rats

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of the periodontal disease extension on the blood profile of Wistar rats. Thirty rats were divided into 3 groups of 10 animals each: C control rats; DP1- rats with periodontal disease in 3 upper molars; DP2 - rats with periodontal disease in 3 upper and 3 lower molars. Periodontal disease was induced by ligature around the tooth according to each group. After 30 days, the animals were killed and 5ml of blood was collected for analyzes of blood count parameters, creatinine, triglycerides and cholesterol. Then the animals were sacrificed and the jaws removed and processed for histopathological analysis to characterize, in H.E. staining, the profile of periodontal disease in each animal. The results from the hematologic tissue were analyzed statistically by ANOVA and Tukey test, with 5% significance level. It can be observed in groups DP1 and DP2 presence of chronic inflammatory infiltrates, connective tissue attachment loss and alveolar bone cortical structure loss, presence of resorptions, presence of biofilm and bone sequestration. As for the blood profile, it is can observe a statistically significant difference between the control group and the groups DP1 and DP2 to the amount of leukocytes and lymphocytes ($p < 0.05$). Further, DP2 group had a higher amount of leukocytes and neutrophils compared to DP1 and control group ($p < 0.05$). It can be concluded that the presence of periodontal disease increases the amount of leukocytes, neutrophils, and lymphocytes in the blood of Wistar rats, and the extent of periodontal disease affects the quantification of leukocytes and neutrophils.

Key Words: Periodontal Diseases, Blood Cell Count , Creatinine, Blood Cells

A doença periodontal (DP) caracteriza-se por todas as condições patológicas que acometem as estruturas do periodonto de proteção e/ou sustentação (Novak 2002). A DP tem sido reconhecida como um fator de risco para determinadas doenças sistêmicas, tais como Diabetes (Cintra et al. 2014a), hipertensão (Rebello et al. 2016), infarto agudo do miocárdio (Sidhu 2016), artrite (Chukkapalli et al. 2016), aterosclerose (Zeng et al. 2016), síndrome coronária aguda (Widén et al. 2016), doença renal crônica (Sharma et al. 2016), obesidade (Bullon et al. 2014), parto prematuro e/ou de baixo peso ao nascer (Pozo et al. 2016), doença pulmonar obstrutiva crônica (Chung et al. 2016), depressão (Kumar et al. 2015), doença de Alzheimer (Ide et al. 2016), estresse (Atri et al. 2015), menopausa (Genco 2013), dentre outras (Scannapieco & Cantos 2000).

Microrganismos anaeróbicos gram negativos, presentes na DP, liberam lipopolissacarídeos (LPS) induzindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias, principalmente por macrófagos, que concomitantemente com as toxinas bacterianas, ativam os linfócitos T que liberam metaloproteinases (MMPs) que, por sua vez, são ativadas por espécies reativas de oxigênio (ERO) (Negrato et al. 2013). Os microrganismos periodontopatogênicos podem colonizar sítios fora da cavidade bucal, além disso, os produtos bacterianos como lipopolissacárido (LPS) e endotoxinas são liberados na circulação sistêmica desencadeando respostas inflamatórias e contribuindo para o comprometimento sistêmico (Kumar 2016).

A relação bidirecional das infecções orais com as manifestações sistêmicas está sendo comprovada e diversos fatores podem influenciar nesta relação. Particularmente em relação à DP, considera-se que a gravidade da doença, assim como a extensão da estrutura periodontal atingida, pode exercer efeitos mais significativos na condição sistêmica (Nibali et al. 2015).

A periodontite agressiva (PA) é caracterizada por lesões mais graves quando comparada a periodontite crônica (PC), apesar da perda do elemento dental ser a consequência de ambas (Benoist et al. 2011). Algumas correlações sistêmicas já foram comprovadas como a relação da presença da gengivite com o aumento da massa ventricular esquerda em pacientes diabéticos do tipo 2 (Franek et al. 2010). Já a Periodontite está associada com aumento da pressão

arterial central e sistêmica, além do aumento da massa ventricular esquerda em pacientes diabéticos do tipo 2 (Franek 2010).

As células sanguíneas têm um papel vital no fornecimento de oxigênio, mantendo hemostasia, e fornecendo proteção para os tecidos periodontais. Estudos mostram que a redução no número ou função de polimorfonucleares, favorece um aumento da taxa e gravidade na destruição dos tecidos periodontais (Kinane 2001). Khan et al. 2015 mostrou diminuição substancial do número total de eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito, VCM, hemoglobina corpuscular média e CHCM com aumento da severidade de destruição periodontal. Assim, tanto as doenças periodontais podem determinar alterações no perfil hematológico (Cintra et al. 2014ab), quanto alterações no perfil hematológico podem ter efeitos prejudiciais sobre a integridade do periodonto (Kinane 2001). Existe um interesse sobre as formas em que as doenças periodontais podem ser responsáveis pelas alterações nas mudanças dos componentes celulares e moleculares do tecido sanguíneo (Loss 2005), e sobretudo com relação a extensão da doença periodontal e seu impacto sistêmico.

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a influência da extensão da doença periodontal sobre o perfil sanguíneo de ratos Wistar, por meio das análises dos parâmetros do hemograma: Hematócrito, Hemoglobina, Hemácias, Plaquetas, CHCM, Leucócitos, Neutrófilos, Linfócitos Monócitos, Eosinófilos, VCM, Creatinina, Colesterol, Triglicérides.

MATERIAL E MÉTODOS

Design experimental

Foram utilizados 30 ratos machos (*Rattus 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°C 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”, exceto nas primeiras

12 horas após a intervenção com apenas água “ad libitum”. Os procedimentos experimentais propostos neste estudo foram aprovados pelo comitê de conduta ética no uso de animais em experimentação (CEUA: 00539- 2012).

Indução da doença periodontal

Os animais foram anestesiados via intramuscular um sedativo à base de xilazina (Dopaser, Calier S.A. - Barcelona, Espanha – 10mg/Kg) e um anestésico à base de Cloridrato de Ketamina a 5% (Vetanarcol, König S. A. – Avellaneda, Argentina – 80mg/Kg).

Após anestesia, a doença periodontal foi induzida por meio da confecção de ligadura em torno do colo dentário dos 3 molares superior direito (Grupo DP1) e dos 3 molares superiores e inferiores direitos (Grupo DP2). Dez animais saudáveis foram utilizados como controle (C) (Tabela 1).

Tabela 1 – Grupos formados de acordo com os procedimentos experimentais

	Doença Periodontal			n total 30
	C n 10	DP1 n 10	DP2 n 10	
GRUPOS	Ratos saudáveis	Ratos com DP em 3 dentes	Ratos com DP em 6 dentes	

Análise do perfil sanguíneo

Após 30 dias da indução da DP, os animais foram novamente anestesiados, o sangue (5ml) coletado por meio de punção cardíaca para as análises de hemograma, creatinina, triglicerídeos e colesterol. As amostras para o hemograma foram colocadas em tubos contendo EDTA, homogeneizadas e armazenadas a -20°C. Para a análise do hemograma, foi utilizado o analisador automático ABX (ABX Micros ABC Vet - Horiba ABX Diagnostics, Montpellier,

France) e o kit ABX VetPack. Foram observados em hemograma os seguintes parâmetros: Hematócrito, Hemoglobina, Hemácias, Plaquetas, Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Volume Corpuscular Médio (VCM), Creatinina, Colesterol, Triglicérides, Leucócitos, Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos, Eosinófilos.

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 kit de Creatinina K Labtest (Labtest Diagnóstica Ind. e Com. Ltda, Lagoa Santa, MG, Brazil) e o método de Jaffé modificado, onde a creatinina reage com o picrato alcalino formando um complexo de cor vermelha.

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) e empregado o kits de Triglicérides Liquiform Labtest (Labtest Diagnóstica Ind. e Com. Ltda, Lagoa Santa, MG, Brazil) e o kit de Colesterol Liquiform Labtest (Labtest Diagnóstica Ind. e Com. Ltda, Lagoa Santa, MG, Brazil)

Os valores aferidos nos diferentes parâmetros do hemograma, na dosagem de creatinina, triglicérides e colesterol foram submetidos à análise estatística por meio da análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, em nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

Análise histológica

Após coleta sanguínea, os animais foram mortos e as maxilas foram removidas e colocadas em frascos individuais devidamente identificados, contendo solução formalina a tamponada (10%) e pH neutro. Após 48 horas as peças foram lavadas em água corrente por um período de 5 horas e desmineralizadas em solução de EDTA a 18%. Na sequência, as hemimaxilas foram, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina.

Foram realizados cortes teciduais em micrótomo Leica RM 2045 (Leica Microsystems, Nussloch – Germany) com 6 µm de espessura e selecionados de forma semi-seriada. Para cada espécime, 10 lâminas com 3 cortes teciduais cada, foram preparadas e coradas com Hematoxilina e Eosina. Os cortes teciduais foram analisados sob microscopia ótica e o perfil da doença periodontal foi descrito para cada grupo.

RESULTADOS

Os valores obtidos e os resultados gerais dos testes estatísticos para perfil hematológico estão apresentados na tabela 2. Os parâmetros hematológicos Hematócrito, Hemoglobina, Hemácias, CHCM, VCM e Creatinina não apresentaram diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$).

Em relação à quantidade de plaquetas, colesterol e triglicérides pode-se observar um discreto aumento quanto maior a extensão da doença periodontal, porém sem diferença estatística ($p>0,05$).

Em relação à quantidade de leucócitos e linfócitos, pode-se observar diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os grupos DP1 e DP2 ($p<0,05$). Ainda, o grupo DP2 apresentou maior quantidade de leucócito e neutrófilos em relação ao grupo DP1 e controle ($p<0,05$).

Para os níveis de monócitos observou-se um aumento na DP1 e redução na DP2, já em relação aos eosinófilos, houve redução progressiva da DP1 para a DP2, em ambos, porém sem diferença estatística ($p>0,05$).

Tabela 2. Média e desvio padrão para os diferentes parâmetros do hemograma

Parâmetros Hematológicos	Grupos			p value
	C	DP1	DP2	
Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	7,90±0,45 ^a	7,93±0,25 ^a	8,00±0,39 ^a	0,820
Hemoglobina (g/dL)	14,63±0,57 ^a	14,49±0,47 ^a	14,62±0,79 ^a	0,857
Hematócrito (%)	43,30±1,63 ^a	43,00±1,69 ^a	43,00±2,35 ^a	0,922

VCM	(μl^3)	54,88 \pm 2,39 ^a	54,24 \pm 2,57 ^a	53,72 \pm 1,90 ^a	0,537
CHCM	(g/dL)	33,80 \pm 1,12 ^a	33,71 \pm 0,93 ^a	34,01 \pm 0,88 ^a	0,790
Leucocitos	($\times 10^3/\mu\text{l}$)	4,81 \pm 0,76 ^a	6,93 \pm 1,10 ^b	8,25 \pm 1,32 ^c	0,000
Neutr3filos	(%)	16,49 \pm 3,07 ^a	18,07 \pm 4,81 ^a	24,49 \pm 6,30 ^b	0,002
	($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1,65 \pm 0,31 ^a	1,81 \pm 0,48 ^a	2,45 \pm 0,63 ^b	0,003
Linf3citos	(%)	30,25 \pm 6,89 ^a	51,19 \pm 7,71 ^b	56,73 \pm 11,40 ^b	0,000
	($\times 10^3/\mu\text{l}$)	3,02 \pm 0,69 ^a	5,11 \pm 0,77 ^b	5,67 \pm 1,14 ^b	0,000
Monocitos	($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,80 \pm 0,48 ^a	1,03 \pm 0,83 ^a	0,92 \pm 0,93 ^a	0,813
Eosin3filos	($\times 10^3/\mu\text{l}$)	0,55 \pm 0,52 ^a	0,37 \pm 0,40 ^a	0,35 \pm 0,59 ^a	0,626
Plaquetas	($\times 10^4/\mu\text{l}$)	64,6 \pm 7,30 ^a	69,3 \pm 11,0 ^a	70,6 \pm 7,83 ^a	0,298
Creatinina	($\mu\text{mol/L}$)	54,80 \pm 6,97 ^a	55,69 \pm 5,96 ^a	58,34 \pm 9,50 ^a	0,565
	(mg/dL)	0,65 \pm 0,08 ^a	0,64 \pm 0,08 ^a	0,60 \pm 0,09 ^a	0,416
Colesterol	(mmol/L)	1,56 \pm 0,19 ^a	1,77 \pm 0,28 ^a	1,65 \pm 0,25 ^a	0,167
	(mg/dL)	60,00 \pm 7,34 ^a	63,60 \pm 9,58 ^a	67,30 \pm 11,27 ^a	0,249
Triglic3rides	(mmol/L)	0,89 \pm 0,34 ^a	0,69 \pm 0,21 ^a	0,77 \pm 0,29 ^a	0,313
	(mg/dL)	61,60 \pm 9,41 ^a	63,00 \pm 7,87 ^a	67,10 \pm 22,74 ^a	0,696

Letras sobrescritas indicam diferença significativa entre os grupos de estudo para cada parâmetro isoladamente (n=10/grupo, Teste de Anova e Teste de Tukey, p<0,05)

C - Controle

DP1 - Doença periodontal molares superior

DP2 - Doença periodontal molares superior e inferior

Quanto aos achados histopatológicos pode-se observar aspectos de normalidade junto aos tecidos periodontais do grupo controle (Figura 1a). Poucas células inflamatórias estavam dispersas e, ao acaso, caracterizando ausência de inflamação. Os vasos sanguíneos apresentavam-se congestionados, o cemento, ligamento e osso alveolar apresentaram-se íntegros e isentos de processo inflamatório ou reabsorção. A inserção conjuntiva e o epitélio juncional demonstraram aspectos de normalidade e integridade tecidual. Este grupo serviu de parâmetro para a análise dos demais onde o comprometimento das estruturas dentárias, de suporte ou sustentação foi avaliado.

Os grupos DP1 e DP2 apresentaram doença periodontal de predominância crônica em todos os espécimes (Figura 1b,c). O infiltrado inflamatório apresentou-se constituído principalmente por células gigantes multinucleadas e alguns focos isolados de concentrado neutrofílico. Evidenciou-se a perda de inserção

conjuntiva e reabsorção da crista óssea alveolar em todos os espécimes. Também foi observada a presença de inflamação e perda de estrutura tecidual na região de furca. As reabsorções dentárias estavam presentes de forma discreta. Observou-se semelhança quanto à doença periodontal nos grupos DP1 (Figura 1b) e DP2 (Figura 1c).

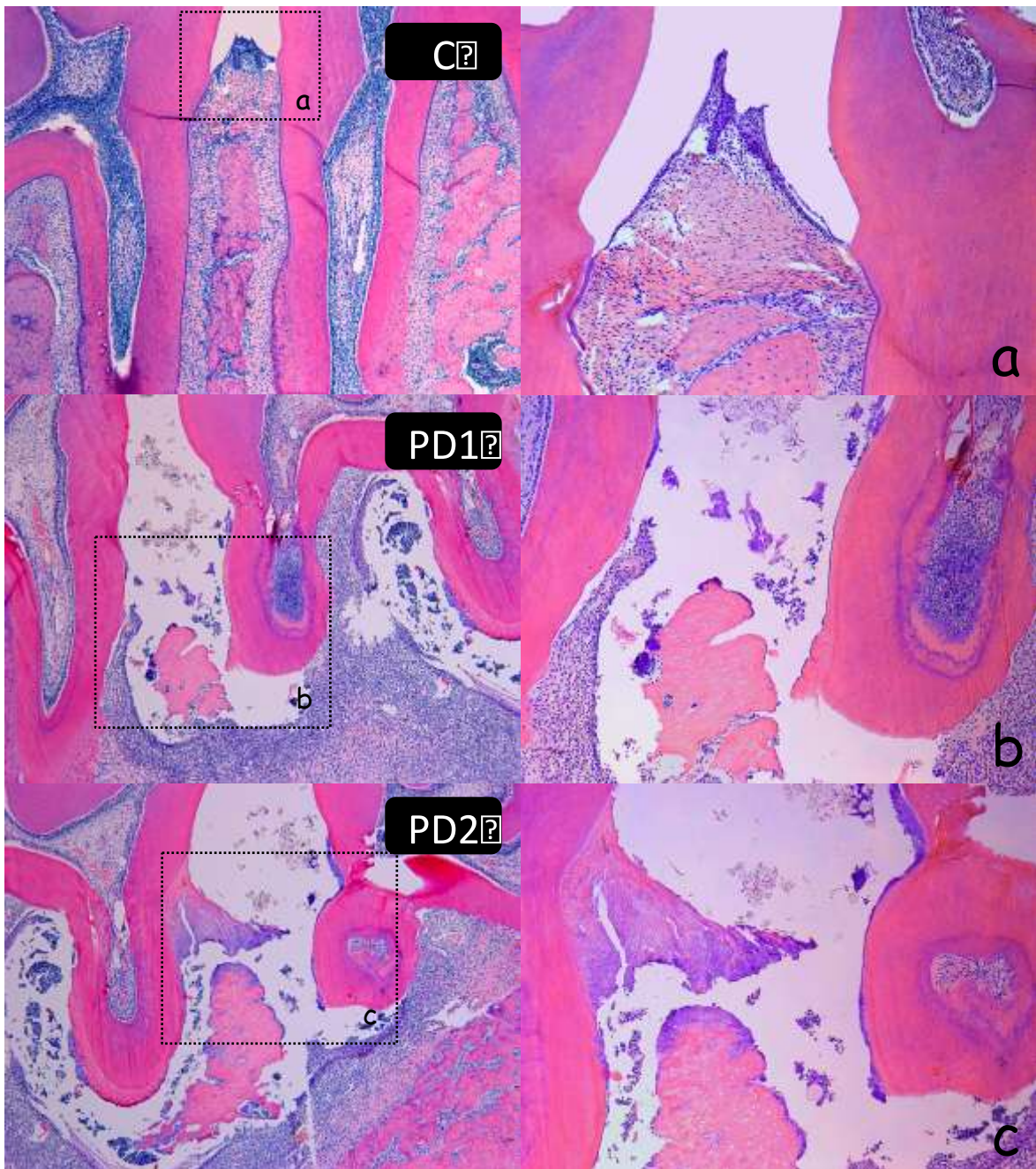


Figura 1 – Aspectos representativos dos grupos controle experimentais: (C) grupo controle denotando normalidade dos tecidos periodontais, H.E., 50x; (a) maior aumento da região de espaço interdentário do grupo controle, evidenciando epitélio juncional, inserção conjuntiva, crista óssea alveolar com aspectos de normalidade, H.E., 100x; (PD1) grupo experimental 1 evidenciando presença de doença periodontal, H.E., 50x; (b) maior aumento da região de espaço interdentário, evidenciando perda do epitélio juncional, da inserção conjuntiva, presença de sequestro ósseo, biofilme aderido sobre a superfície radicular e junto ao tecido ósseo, H.E., 100x; (PD2) grupo experimental 2 evidenciando presença de doença periodontal, H.E., 50x; (c) maior aumento da região de espaço interdentário, evidenciando perda do epitélio juncional, da inserção conjuntiva, presença de sequestro ósseo, biofilme aderido sobre a superfície radicular em grande área do tecido conjuntivo, e biofilme extenso sobre o tecido ósseo, H.E., 50x.

DISCUSSÃO

Este trabalho avaliou a influencia da extensão da DP sobre o perfil hematológico, considerando os parâmetros: Hematócrito, Hemoglobina, Hemácias, Plaquetas, CHCM, Leucócitos, Neutrófilos, Linfócitos Monócitos, Eosinófilos, VCM, Creatinina, Colesterol, Triglicérides. O presente estudo é o primeiro a comparar a alteração do perfil hematológico com a extensão da doença periodontal utilizando um modelo animal padronizado.

O método utilizado para indução da DP é consagrado na literatura e utilizado em diferentes estudos (Cintra et al. 2014ab, Silva et al. 2015, Jing et al. 2016, Cavagni et al. 2016, Balci Yuce et al. 2014). Diante dos achados histológicos observou-se que todos os espécimes que sofreram a ligadura em torno do colo dentário apresentaram-se portadores da DP, o que, confirma o sucesso do método de indução. Acrescenta-se também que o perfil da doença mostrou-se semelhante em todos os espécimes, também corroborando com estudos anteriores (Cintra et al. 2014ab).

A análise do perfil hematológico através do exame de sangue é uma ferramenta importante, pois permite a avaliação quantitativa e qualitativa das células do sangue, sais e proteínas, permitindo o diagnóstico de doenças, resposta do indivíduo a infecção e até mesmo a progressão de um tratamento (Gkrania-Klotsas et al. 2010). O método de análise do perfil hematológico é frequentemente utilizado em pesquisas desta natureza, na busca de se identificar o impacto das doenças orais na saúde sistêmica (Cintra et al. 2014ab, Kumar et al. 2014, Malhotra et al. 2012, Landzberg et al. 2015, Gonçalves et al. 2014).

Com relação aos resultados obtidos, observou-se que os parâmetros Hematócrito, Hemoglobina, Hemácias, CHCM, VCM e Creatinina não apresentaram diferença entre os grupos. Assim a presença da DP em maior ou menor extensão não foi capaz de influenciar estes resultados de forma significativa. Tais achados se assemelham aos resultados obtidos por Pontes Andersen et al., (2008), como também por Gulle et al. (2014) que não encontraram diferenças significativas..

Por outro lado, Naik et al. (2010) encontraram resultados que mostraram diminuição da hemoglobina, glóbulos vermelhos, hematócrito, CHCM, enquanto que o VCM e taxa de sedimentação de eritrócitos mostrou-se aumentada para os pacientes com DP.

Em nosso estudo à quantidade de plaquetas, colesterol e triglicérides mostrou-se um discreto aumento quanto maior a extensão da doença periodontal, porém sem diferença estatística. Para o perfil lipídico, observação semelhante foi encontrada por Nibali et al. (2015) e Cintra et al. (2013c), e por Kumar et al. (2014) que encontraram aumento dos níveis de LDL e diminuição dos níveis de HDL em indivíduos com periodontite crônica. Estudo realizado por López et al. (2012) em adolescentes com periodontite não encontrou diferenças nos valores sobre a quantidade de plaquetas, resultado semelhante ao nosso estudo.

Para os níveis séricos de monócitos observou-se um aumento na DP1 e redução na DP2, porém sem diferença estatisticamente significativa. Já Miyajima et al. (2014) encontrou evidências do aumento dos monócitos na presença de periodontite crônica, assim como Jagannathan et al. (2014) encontrou aumento da proporção de monócitos/ macrófagos no sangue periférico de pacientes com

periodontite crônica. Corroborando com nosso estudo Carneiro et al.(2012) não encontraram diferença estatisticamente significativa nos valores para monócitos e eosinófilos.

Em relação aos eosinófilos houve uma redução progressiva da DP1 para a DP2, em ambos, porém sem diferença. Contrapondo nossos achados Suzuki et al. (1995) encontraram um aumento dos eosinófilos no fluido crevicular gengival em pacientes com periodontite, semelhante ao estudo de Kolte et al. (2014), que também encontrou um aumento dos eosinófilos, onde avaliou e comparou os vários parâmetros sanguíneos em indivíduos saudáveis e pacientes com periodontite crônica grave.

Com relação à quantidade de leucócitos pode-se observar tanto aumento em função da presença da DP, semelhante ao achado de Anand et al. (2016) e de Pejčić et al. (2011), quanto forte influência da extensão da doença. Estes últimos achados são inéditos e está correlacionado com a quantidade de dentes envolvidos. Já a quantidade de linfócito também esteve aumentada, diferente dos resultados de Anand (2016) e semelhante aos resultados de Pejčić et al. (2011), no entanto sem influência quanto à extensão da DP.

Com relação a quantidade de neutrófilos, estudos de Pejčić et al. (2011) relacionou a periodontite crônica moderada com periodontite crônica generalizada observando aumento significativo deste índice, já em nosso estudo a diferença foi em função da extensão da doença. Este achado também é inédito e indica que para o modelo animal murino a extensão e/ou quantidade de dentes envolvidos exerce efeito significativo no aumento do número de neutrófilos séricos.

Diante dos achados do presente estudo pode-se inferir que a extensão da DP alterar ainda mais alguns parâmetros sanguíneos e este achado fortalece a relação entre as infecções de origem dentária com as alterações sistêmicas.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a presença da doença periodontal eleva a quantidade de leucócitos, neutrófilo e linfócitos no sangue de ratos Wistar, e que, a extensão da doença periodontal influencia na quantificação de leucócitos e neutrófilos.

REFERÊNCIAS

- Anand PS, Sagar DK, Mishra S, Narang S, Kamath KP, Anil S. Total and Differential Leukocyte Counts in the Peripheral Blood of Patients with Generalised Aggressive Periodontitis. *Oral Health Prev Dent*. 2016 Jun 27.
- Atri M, Srivastava D, Kharbanda J, Bugalia A, Yousuf A, Anup N. Occupational Stress, Salivary Cortisol, and Periodontal Disease: A Clinical and Laboratory Study. *J Int Oral Health*. 2015 Sep;7(9):65-9.
- Balci Yuce H1, Toker H, Goze F *Acta Odontol Scand*. 2014 Nov;72(8):729-36. Epub 2014 Apr 11. The histopathological and morphometric investigation of the effects of systemically administered boric acid on alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in diabetic rats.
- Benoist HM, Seck-Diallo A, Diouf A, Yabbre S, Sembene M, Diallo PD *J Periodontal Implant Sci* 2011;41:279-284. Profile of chronic and aggressive periodontitis among Senegalese.
- Bullon P, Newman HN, Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Periodontol 2000*. 2014 Feb;64(1):139-53.
- Carneiro VMMA, Bezerra ACB, Guimarães M, Muniz-Junqueira MI. Decreased phagocytic function in neutrophils and monocytes from peripheral blood in periodontal disease. *Journal of Applied Oral Science*. 2012;20(5):503-509.
- Cavagni Juliano ; De Macedo, Isabel Cristina ; Gaio, Eduardo José ; Souza, Andressa ; De Molon, Rafael Scaf ; Cirelli, Joni Augusto ; Hoefel, Ana Lúcia ; Kucharski, Luiz Carlos ; Torres, Iraci Lucena Da Silva ; Rösing, Cassiano Kuchenbecker Obesity and Hyperlipidemia Modulate Alveolar Bone Loss in Wistar Rats. *Journal of periodontology*, February 2016, Vol.87(2), pp.e9-17
- Chukkapalli S, Rivera-Kweh M, Gehlot P, Velsko I, Bhattacharyya I, Calise SJ, Satoh M, Chan EK, Holoshitz J, Kesavalu L. Periodontal bacterial

- colonization in synovial tissues exacerbates collagen-induced arthritis in B10.RIII mice. *Arthritis Res Ther.* 2016 Jul 12;18(1):161.
- Chung JH, Hwang HJ, Kim SH, Kim TH. Associations Between Periodontitis and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: The 2010 to 2012 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol.* 2016 Aug;87(8):864-71.
- Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, de Lima VM, Sumida DH, Coclete GA, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Apical periodontitis and periodontal disease increase serum IL-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. *Clin Oral Investig.* 2014b Dec;18(9):2123-8.
- Cintra LT, Samuel RO, Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Bomfim SR, Souza JC, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. *Int Endod J.* 2014a Mar;47(3):228-37.
- Cintra LTA, Facundo ACS, Azuma MM, Sumida DH, Astolphi RD, Bomfim SEM, Narciso LG Gomes-Filho JE Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats, *Clin Oral Invest* (2013) 17:1595–1599
- Dai, Jing ; Ma, Yihui ; Shi, Miusi ; Cao, Zhengguo ; Zhang, Yufeng ; Miron, Richard Initial changes in alveolar bone volume for sham-operated and ovariectomized rats in ligature-induced experimental periodontitis *J Clinical oral investigations*, April 2016, Vol.20(3), pp.581-8
- Franek E, Napora M, Blach A, Budlewski T, Gozdowski D, Jedynasty K, Krajewski J, Gorska R *J Clin Periodontol.* 2010 Oct;37(10):875-80. Aug 27. Blood pressure and left ventricular mass in subjects with type 2 diabetes and gingivitis or chronic periodontitis.
- Genco RJ, Borgnakke WS: Risk factors for periodontal disease. *Periodontol*, 2000; 2013; 62(1): 59–94.
- Gkrania-Klotsas E, Ye Z, Cooper AJ, et al. Differential white blood cell count and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of cross-sectional and prospective studies. 2010:5

- Gonçalves DC Evangelista RC, da Silva RR , Santos MJ , Silva FS Jr , Aragão KS , Brito GA , Lucena HB , Leitão RC , Oriá RB *Exp Biol Med* (Maywood). 2014 Apr; 239 (4): 442-53. *Infliximab atenua osteólise inflamatória num modelo de periodontite em Wistar .*
- Gulle K, Akpolat M, Kurcer Z, Cengiz MI, Baba F, Acikgoz S. Multi-organ injuries caused by lipopolysaccharide-induced periodontal inflammation in rats: role of melatonin. *J Periodont Res* 2014; 49: 736–741.
- Ide M, Harris M, Stevens A, Sussams R, Hopkins V, Culliford D, Fuller J, Ibbett P, Raybould R, Thomas R, Puenter U, Teeling J, Perry VH, Holmes C. Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *PLoS One*. 2016 Mar 10;11(3).
- Jagannathan, Raghunathan ; Lavu, Vamsi ; Rao, Suresh Ranga Comparison of the proportion of non-classic (CD14+CD16+) monocytes/macrophages in peripheral blood and gingiva of healthy individuals and patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontology*, June 2014, Vol.85(6), pp.852-8
- Kinane DF, Marshall GJ. Periodontal manifestations of systemic disease. *Aust Dent J* 2001;46(1):2-12.
- Kolte RA, Kolte AP, Deshpande NM Assessment and comparison of anemia of chronic disease in healthy subjects and chronic periodontitis patients: A clinical and hematological study. *J Indian Soc Periodontol*. 2014 Mar;18(2):183-6.
- Kumar P.S From focal sepsis to periodontal medicine: a century of exploring the role of the oral microbiome in systemic disease. *J Physiol*. 2016 Jul 18. From focal sepsis to periodontal medicine: a century of exploring the role of the oral microbiome in systemic disease.
- Kumar PS. From focal sepsis to periodontal medicine: a century of exploring the role of the oral microbiome in systemic disease. *J Physiol*. 2016 Jul
- Kumar, Balmuri P ; Khaitan, Tanya ; Ramaswamy, Pachigolla ; Sreenivasulu, Pattipati ; Uday, Ginjupally ; Velugubantla, Ragha G Association of

- chronic periodontitis with white blood cell and platelet count - A Case Control Study *Journal of clinical and experimental dentistry*, July 2014, Vol.6(3), pp.e214-7
- Landzberg, M ; Doering, H ; Aboodi, G M ; Tenenbaum, H C ; Glogauer, M
Quantifying oral inflammatory load: oral neutrophil counts in periodontal health and disease *Journal of periodontal research*, June 2015, Vol.50(3), pp.330-6
- Loos BG. Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol* 2005;76 11 Suppl:2106-15.
- López R, Loos BG, Baelum V. *Clin Oral Investig*. 2012 Aug;16(4):1209-16. Epub 2011 Oct 19. Hematological features in adolescents with periodontitis.
- Malhotra, Ranjan ; Kapoor, Anoop ; Grover, Vishakha ; Grover, Deepak ; Kaur, Effect of scaling and root planing on erythrocyte count, hemoglobin and hematocrit in patients with chronic periodontal disease.(Research)(Report) *Journal of Dental Hygiene*, Summer, 2012, Vol.86(3), p.195(9)
- Mendonça Pereira, Luciano José
 β -Glucans (*Saccharomyces cerevisiae*) Reduce Glucose Levels and Attenuate Alveolar Bone Loss in Diabetic Rats with **Periodontal Disease** *PloS one*, 2015, Vol.10(8), pp.e0134742
- Negrato C. A., Tarzia O., Jovanovic L., Chinellato L. E. M., Periodontal disease and diabetes mellitus, *J Appl Oral Sci*. 2013;21(1):1-12
- Nibali L, Rizzo M, Li Volti G, D'Aiuto F, Giglio RV, Barbagallo I, Pelekos G, Donos N. Lipid subclasses profiles and oxidative stress in aggressive periodontitis before and after treatment. *J Periodontal Res*. 2015 Dec;50(6):890-6.
- Nibali L, Rizzo M, Li Volti G, D'Aiuto F, Giglio RV, Barbagallo I, Pelekos G, Donos N. Lipid subclasses profiles and oxidative stress in aggressive periodontitis before and after treatment. *J Periodontal Res*. 2015 Dec;50(6):890-6.

- Novak M. J. Classification of disease and conditions affecting the periodontium. In: Newman, M. G.;Takei, H. H.; Carranza, F. A. Carranza's Clinical Periodontology. 9. ed. Califórnia: W. B.Saunders Company, 2002. p. 64-73
- Nubesh Khan, Roji Luke, Rino Soman, Praveen Krishna, Iqbal Safar and Senthil Qualitative assessment of red blood cell parameters for signs of anemia in patients with chronic periodontitis Swaminathan *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*. 5.6
- O'brien PJ. Antioxidants and Cancer: molecular mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 1994; 366: 215–239.
- Ohnaka K, Kono S, Inoguchi T, Yin G, Morita M, Adachi M, Kawate H, Takayanagi R. Inverse associations of serum bilirubin with high sensitivity C-reactive protein, glycated hemoglobin, and prevalence of type 2 diabetes in middle-aged and elderly Japanese men and women. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Apr;88(1):103-10.
- Patel SP, Rao NS, Pradeep AR. Effect of nonsurgical periodontal therapy on crevicular fluid and serum glutathione peroxidase levels. *Dis Markers*. 2012 Jan 1;32(1):1-7.
- Pejčić A, Kesić L, Pesić Z, Mirković D, Stojanović M *Acta Clin Croat*. 2011 Jun;50(2):159-67. White blood cell count in different stages of chronic periodontitis.
- Pınar Gümuüşx, Nurcan Buduneli, Sxevki Cxetinkalp, Samuel I. Hawkins, Diane Renaud, Denis F. Kinane and David A. Scott. Salivary Antioxidants in Patients With Type 1 or 2 Diabetes and Inflammatory Periodontal Disease: A Case-Control Study. *J Periodontol* • September 2009. Volume 80 • Number 9 :1440-1446.
- Pontes Andersen CC1, Holmstrup P, Buschard K, Flyvbjerg A. Renal Alterations in Prediabetic Rats With Periodontitis, *J Periodontol* • April 2008, Volume 79 • Number 4
- Pozo E, Mesa F, Ikram MH, Puertas A, Torrecillas-Martínez L, Ortega-Oller I, Magán-Fernández A, Rodríguez-Martínez MD, Padiál-Molina M, Sánchez-Fernández E, Galindo-Moreno P, O'Valle F. Preterm birth

- and/or low birth weight are associated with periodontal disease and the increased placental immunohistochemical expression of inflammatory markers. *Histol Histopathol.* 2016 Feb;31(2):231-7.
- 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.
- Randa Diab-Ladki · Bernard Pellat · Ramez Chahine *Clin Oral Invest* (2003) 7:103–107 Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases
- Rebelo MA, de Castro PH, Rebelo Vieira JM, Robinson PG, Vettore MV. Low Social Position, Periodontal Disease and Poor Oral Health-Related Quality of Life in Adults With Systemic Arterial Hypertension. *J Periodontol.* 2016 Jul 29:1-16.
- Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 212:167–78.
- Scannapieco FA, Cantos A. Oral inflammation and infection, and chronic medical diseases: implications for the elderly. *Periodontol 2000.* 2016 Oct;72(1):153-75.
- Sharma P, Dietrich T, Ferro CJ, Cockwell P, Chapple IL. Association between periodontitis and mortality in stages 3-5 chronic kidney disease: NHANES III and linked mortality study. *J Clin Periodontol.* 2016 Feb;43(2):104-13.
- Shi GX, Liu CZ, Wang LP, Guan LP, Li SQ. Biomarkers of oxidative stress in vascular dementia patients. *Can J Neurol Sci.* 2012 Jan; 39(1): 65-8.
- Shin-ichi Miyajima , Keiko Naruse , Yasuko Kobayashi , Nobuhisa Nakamura, Toru Nishikawa , Kei Adachi , Yuki Suzuki , Takeshi Kikuchi , Akio Mitani , Makoto Mizutani , Norikazu Ohno , Toshihide Noguchi & Tatsuaki Matsubara. Periodontitis-activated monocytes/ macrophages cause aortic inflammation. 4 : 5171 2014

- Sidhu RK. Association between Acute Myocardial Infarction and Periodontitis: A Review of the Literature. *J Int Acad Periodontol.* 2016 Jan 14;18(1):23-33.
- Silva, Viviam De Oliveira ; Lobato, Raquel Vieira ; Andrade, Eric Francelino ; De Macedo, Cristina Gomes ; Napimoga, Juliana Trindade Clemente ; Napimoga, Marcelo Henrique ; Messoria, Michel Reis ; Murata, Ramiro
- Soory M., Redox Status in Periodontal and Systemic Inflammatory Conditions Including Associated Neoplasias: Antioxidants as Adjunctive Therapy *Infectious Disorders - Drug Targets* 2009, 9, 415-427
- Suzuki T, Sugita N, Yoshie H, Hara K: Presence of activated eosinophils. High IgE and sCD23 titers in gingival crevicular fluid of patients with adult periodontitis. *J Periodont Res* 1995; 30: 159-166.
- Tayal D, Goswami B, Tyagi S, Chaudhary M, Mallika V. Interaction between dyslipidaemia, oxidative stress and inflammatory response in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Cardiovasc J Afr.* 2012 Jan-Feb; 23(1): 23-7.
- V. Kumar , V. Ranganath , R. Naik , S. Banu , A. S. Nichani *J Periodont Res* 2014; 49: 836–844 Assessment of highsensitivity C-reactive protein and lipid levels in healthy adults and patients with coronary artery disease, with and without periodontitis – a cross-sectional study K. R
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Iza-kovic, M., and Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* (2006) 160, 1–40.
- Vasconcelos S.M.L, Goulart M.O.F., Moura J.B.F Manfredini V. Benfato M.S., Kubota L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 5, 1323-1338, 2007
- Vidya Naik , Aneesha Acharya , Vijay L. Deshmukh , Sharath Shetty & Ravi Shirhatti *Journal of Investigative and Clinical Dentistry* (2010), 1, 139–

- 143 Generalized, severe, chronic periodontitis is associated with anemia of chronic disease: a pilot study in urban, Indian males
West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. British Diabetic Association. Diabetic Medicine, 2000; 17 171-80.
- Widén C, Holmer H, Coleman M, Tudor M, Ohlsson O, Sättlin S, Renvert S, Persson GR. Systemic inflammatory impact of periodontitis on acute coronary syndrome. J Clin Periodontol. 2016 Sep;43(9):713-9.
- Zeng XT, Leng WD, Lam YY, Yan BP, Wei XM, Weng H, Kwong JS. Periodontal disease and carotid atherosclerosis: A meta-analysis of 17,330 participants. Int J Cardiol. 2016 Jan 15;203:1044-51.
- Zhang Y, Zhang L, Sun D, Li Z, Wang L, Liu P. Genetic polymorphisms of superoxide dismutases, catalase, and glutathione peroxidase in age-related cataract. Mol Vis.2011;17:2325-32. Epub 2011 Aug 30.

IV ANEXOS.

ANEXO 1

Clinical Oral Investigations

TYPES OF PAPERS

Papers may be submitted for the following sections:

Original articles

Invited reviews

Short communications

Letters to the editor

It is the general policy of this journal not to accept case reports and pilot studies.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

The Springer Author Academy is a set of comprehensive online training pages mainly geared towards first-time authors. At this point, more than 50 pages offer advice to authors on how to write and publish a journal article.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. J Mol Med. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California
Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

Tables All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table. Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and illustrations guidelines

Electronic Figure Submission Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide. Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art Definition:

Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible.

Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white.

A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8- pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc. Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text.

Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format.

Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Integrity of research and reporting

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

Conflict of interest

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. They should also state that they have full control of all primary data and that they agree to allow the journal to review their data if requested.

Therefore the manuscript must be accompanied by the “Conflict of Interest Disclosure Form”. To download this form, please follow the hyperlink on the right.

The manuscript must also be accompanied by the “Authorship & Disclosure Form”. To download this form, please follow the hyperlink on the right.

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, Índia 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, Índia 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