

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

EFEITO DA INDUÇÃO DE PERIODONTITE NOS ÓRGÃOS REPRODUTORES FEMININOS E INFLAMAÇÃO SISTÊMICA EM RATOS

Trabalho submetido por
Ana Clara da Cruz Pimenta
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

junho de 2023



EGAS MONIZ SCHOOL
of HEALTH & SCIENCE

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
EGAS MONIZ

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

EFEITO DA INDUÇÃO DE PERIODONTITE NOS ÓRGÃOS REPRODUTORES FEMININOS E INFLAMAÇÃO SISTÊMICA EM RATOS

Trabalho submetido por
Ana Clara da Cruz Pimenta
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof^ª. Doutora Vanessa Machado

junho de 2023

*Recomeça...
Se puderes
Sem angústia
E sem pressa.
E os passos que deres,
Nesse caminho duro
Do futuro
Dá-os em liberdade.
Enquanto não alcances
Não descanses
De nenhum fruto queiras só metade.
E, nunca saciado,
Vai colhendo
Ilusões sucessivas no pomar
Sempre a sonhar
E vendo,
Acordado,
O logro da aventura.
És Homem, não te esqueças!
Só é tua a loucura
Onde, com lucidez, te reconheças.*

Miguel Torga, in “Diário vols. XII a XVI”

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof.^a Doutora Vanessa Machado, o meu maior e mais sincero agradecimento por me ter integrado nesta investigação sobre um tema que tanto interesse despertou em mim. É um privilégio ter-me cruzado consigo no meu percurso académico e ter sido sua orientanda. A Professora é, para mim, uma inspiração e um exemplo de conhecimento, dedicação, entusiasmo e brio.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, por me ter permitido realizar o meu maior sonho – ser Médica Dentista. Agradeço a todos com quem tive a oportunidade de me cruzar ao longo do meu percurso académico: professores, funcionários e colegas.

À minha Mãe, por ser a minha melhor amiga, por todo o amor, carinho e apoio que sempre me deu. Ao meu Pai por ter sido sempre tão presente, dedicado e amigo. Obrigada por sempre terem acreditado em mim e por me terem proporcionado a oportunidade de tornar o meu sonho realidade. Ao meu irmão Afonso, por todas as experiências partilhadas e memórias criadas. Amo-vos aos três eternamente.

À minha avó Maria, por todas as longas conversas, pela sabedoria e força inabalável e por me tornar numa pessoa mais confiante e agradecida. À minha avó Fernanda, por todo o carinho e motivação que sempre me deu.

Ao Alexandre, pelo companheirismo e por todo o apoio que sempre me deu, não só na elaboração desta tese como em todas as fases da minha vida. Às minhas amigas de uma vida: Alice, Joana, Marta e Teresa, obrigada por todas as vezes que me apoiaram e que me deram força para continuar a perseguir os meus sonhos.

À minha amiga e colega de Box, Catarina, obrigada por teres sido a melhor companheira de 5 anos incríveis. Palavras nunca serão suficientes para descrever o que aqui vivemos juntas. A Box 75 vai estar para sempre no meu coração.

Às minhas amigas com quem tive a oportunidade de privar ao longo destes 5 anos inesquecíveis – Catarina, Filipa, Margarida, Flávia, Marta, Filipa, Beatriz, Laura, Inês, Maria Inês e Joana. Obrigada por terem tornado este caminho mais bonito e fácil de percorrer.

Resumo

Objetivos: Avaliar os efeitos sanguíneos e nos órgãos reprodutores femininos da indução de periodontite em modelo animal de rato.

Materiais e Métodos: Catorze ratos fêmea Wistar foram divididos em grupo controle (n=4) e experimental (n=10, 5 animais para cada protocolo). A indução de periodontite foi realizada através da colocação de ligadura de seda 5-0 ao redor do segundo molar bilateral superior, permanecendo ao longo de todo o período experimental. Aos 21 e 28 dias os animais foram eutanasiados através de deslocação cervical. A perda óssea alveolar foi avaliada por histomorfologia, o grau de inflamação periodontal e dos órgãos reprodutores femininos através de análise histológica, e foram medidos os níveis séricos de vários parâmetros sanguíneos.

Resultados: A maior perda óssea foi a disto-vestibular (21 dias 0.67 ± 0.17 vs 0.24 ± 0.07) e disto-palatino (21 dias 0.65 ± 0.09 vs 0.22 ± 0.05 ; 28 dias 0.58 ± 0.34 vs 0.26 ± 0.02). A nível histológico, no periodonto verificou-se um aumento de neutrófilos, especialmente aos 21 dias. O útero foi o órgão reprodutor feminino mais afetado pela periodontite, com um elevado número de eosinófilos. A nível sanguíneo, nos grupos experimentais, existiu aumento de neutrófilos (15.76 ± 4.68 vs 8.05 ± 0.49 ; 13.1 ± 8.62 vs 6.95 ± 2.19), proteína C reativa (28 dias 0.005 ± 0.01 vs 0.000 ± 0.00), fosfatase alcalina (21 dias 108.20 ± 25.33 vs 68.5 ± 13.44), TASO (2.63 ± 3.36 vs 1.20 ± 1.41 ; 5.78 ± 9.32 vs 2.55 ± 0.64), IgA (21 dias 1.46 ± 0.30 vs 0.90 ± 0.00) e IgG (28 dias 73.38 ± 8.45 vs 59.50 ± 0.71). Contrariamente, verificou-se uma diminuição de linfócitos (82.62 ± 4.39 vs 90.10 ± 0.42 ; 84.94 ± 9.88 vs 91.50 ± 2.55), estradiol (14.58 ± 13.29 vs 24.40 ± 24.89 ; 14.94 ± 12.71 vs 25.30 ± 22.34), progesterona (21 dias 9.84 ± 3.01 vs 14.15 ± 9.69), ferro (21 dias 419 ± 45.74 vs 478.50 ± 54.45) e ureia (42.34 ± 2.38 vs 46.00 ± 1.41 ; 42.6 ± 4.34 vs 45.50 ± 0.71).

Conclusões: Os parâmetros inflamatórios aumentados no sangue e no útero apresentam correlação clínica com periodontite.

Palavras-chave: Periodontite; Inflamação; Órgãos Reprodutores Femininos; Ratos.

Abstract

Aims: To evaluate the effects on blood and female reproductive organs of inducing periodontitis in a rat animal model.

Materials and Methods: Fourteen female Wistar rats were divided into a control group (n=4) and an experimental group (n=10, 5 animals for each protocol used). The induction of periodontitis was performed by 5-0 silk ligature around the upper bilateral second molar and remained throughout the experiment. At 21 and 28 days the animals were euthanized by cervical dislocation. Alveolar bone loss was assessed by histomorphology, the degree of periodontal inflammation and in the female reproductive organs by histological analysis and serum levels of several blood parameters were measured.

Results: The highest bone loss was distobuccal (21 days 0.67 ± 0.17 vs 0.24 ± 0.07) and disto-palatal (21 days 0.65 ± 0.09 vs 0.22 ± 0.05 ; 28 days 0.58 ± 0.34 vs 0.26 ± 0.02). At histological level, in the periodontium there was an increase in inflammatory neutrophils, especially at 21 days. The uterus was the female reproductive organ most affected by periodontitis, with a high number of eosinophils. At blood level, in the experimental groups, there was an increase in neutrophils (15.76 ± 4.68 vs 8.05 ± 0.49 ; 13.1 ± 8.62 vs 6.95 ± 2.19), C-reactive protein (28 days 0.005 ± 0.01 vs 0.000 ± 0.00), alkaline phosphatase (21 days 108.20 ± 25.33 vs 68.5 ± 13.44), TASSO (2.63 ± 3.36 vs 1.20 ± 1.41 ; 5.78 ± 9.32 vs 2.55 ± 0.64), IgA (21 days 1.46 ± 0.30 vs 0.90 ± 0.00) and IgG (28 days 73.38 ± 8.45 vs 59.50 ± 0.71). In contrast, they showed decreased lymphocytes (82.62 ± 4.39 vs 90.10 ± 0.42 ; 84.94 ± 9.88 vs 91.50 ± 2.55), estradiol (14.58 ± 13.29 vs 24.40 ± 24.89 ; 14.94 ± 12.71 vs 25.30 ± 22.34), progesterone (21 days 9.84 ± 3.01 vs 14.15 ± 9.69), iron (21 days 419 ± 45.74 vs 478.50 ± 54.45) and urea (42.34 ± 2.38 vs 46.00 ± 1.41 ; 42.6 ± 4.34 vs 45.50 ± 0.71).

Conclusions: Increased inflammatory parameters in blood and endometrium showed clinical correlation with periodontitis.

Keywords: Periodontitis; Inflammatory Burden; Female Reproductive Organs; Rats.

Índice

I.	INTRODUÇÃO.....	13
1.	SAÚDE.....	13
2.	SAÚDE ORAL	13
3.	SAÚDE PERIODONTAL	14
4.	DOENÇA PERIODONTAL.....	16
4.1.	Epidemiologia e Prevalência	17
4.2.	Fatores Etiológicos da Periodontite	19
4.3.	Fatores de Risco da Periodontite	21
4.4.	Manifestações Sistêmicas da Periodontite.....	22
4.4.1.	Associação da Periodontite com Patologias do Sistema Reprodutor Feminino	23
5.	IMPORTÂNCIA DOS MODELOS ANIMAIS NO ESTUDO DA PERIODONTITE	25
5.1.	Métodos de Indução de Periodontite em Ratos	26
5.1.1.	Estudos em animais relacionando a periodontite com patologias inflamatórias sistêmicas.....	30
II.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
2.1.	Ética.....	33
2.2.	Caracterização da Amostra	33
2.3.	Cuidado Animal.....	34
2.4.	Indução de Periodontite	34
2.5.	Processamento e Análise Macroscópica da Reabsorção Óssea Alveolar ..	34
2.6.	Processamento e Análise Histológica.....	35
2.7.	Análise Sanguínea	36
2.8.	Análise Estatística.....	37
III.	RESULTADOS	39
3.1.	Análise Macroscópica da Reabsorção Óssea Alveolar.....	39
3.2.	Análise Histológica.....	41
3.3.	Análise Sanguínea	42
IV.	DISCUSSÃO.....	49
4.1.	Principais Resultados.....	49

4.2. Forças e Limitações	52
4.3. Perspetivas Futuras	53
V. CONCLUSÃO.....	55
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	

Lista de Figuras

Figura 1 Constituição do periodonto.....	16
Figura 2 Cooperação polimicrobiana e disbiose na periodontite e gengivite.....	17
Figura 3 Mecanismo biológico da periodontite.....	20
Figura 4 Periodontite e sua associação com patologias sistêmicas.....	23
Figura 5 Periodontite associada a <i>outcomes</i> negativos da gravidez.....	25
Figura 6 Método de indução de periodontite através da colocação de ligaduras.....	29
Figura 7 Distribuição da amostra.....	33
Figura 8 Fotografias das superfícies vestibulares e palatinas obtidas através do estereomicroscópio.....	40
Figura 9 Gráfico representativo da perda óssea alveolar por localização medida.....	40
Figura 10 Gráficos representativos dos níveis de vários componentes sanguíneos nos grupos experimentais e nos grupos controlos.....	43

Lista de Tabelas

Tabela 1 Tabela de pontuação para a inflamação e necrose referente à análise histológica.....	36
Tabela 2 Tabela dos resultados obtidos das medições de perda óssea alveolar por localização.....	41
Tabela 3 Tabela referente às análises sanguíneas e sua análise estatística.....	44

Lista de Siglas

AAP	<i>American Academy of Periodontology</i>
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CK	Creatinina Quinase
DGS	Direção Geral de Saúde
DDS	Dextran Sulfato de Sódio
DGAV	Direção Geral de Medicina Veterinária e Alimentar
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFP	<i>European Federation of Periodontology</i>
FDI	Federação Dentária Internacional
FSH	Hormona Folículo-Estimulante
HCT	Hematócrito
HE	Hematoxilina Eosina
IG	Imunoglobulinas
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina-1
IL-1β	Interleucina-1 Beta
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
GGT	Gamaglutamiltransferase
JAC	Junção Amelocementária
LBW	Baixo Peso à Nascimento
LDH	Lactato Desidrogenase
LGI	Inflamação de Baixo Grau
LH	Hormona Luteínica
LPD	Ligamento Periodontal
LPS	Lipopolissacáridos
MMPS	Metaloproteinases
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde

OPG | Osteoprotegerina
PCR | Proteína C Reativa
PGE2 | Prostaglandina E2
PLT | Contagem de plaquetas
PMNs | Neutrófilos Polimorfonucleares
PTB | Nascimento Pré-Termo
RANK | Recetor Ativador do Fator Nuclear Kappa B
RANKL | Recetor Ativador do Fator Nuclear Kappa B Ligante
RBC | Contagem de Eritrócitos
SGA | Pequeno para a Idade Gestacional
TASO | Antiestreptolisina
TSH | Hormona Estimulante da Tiróide
TNF- α | Fator de Necrose Tumoral-alfa
TNBS | Ácido 2,4,6-trinitrobenzóico
T3 | Triiodotironina
T4 | Tiroxina

I. INTRODUÇÃO

1. SAÚDE

A Saúde é mencionada na Declaração Universal dos Direitos Humanos como um direito humano fundamental, sendo referido que todas os indivíduos devem ter acesso a recursos básicos de saúde de forma igualitária, ou seja, sem distinção de raça, religião, crença política ou condição económica e social (*Diário da República, I Série, n.º 57/78, de 9 de março de 1978*). Assim, nas últimas décadas, assistiu-se a uma evolução do conceito de Saúde, tendo sido no ano de 1946 que, a Organização Mundial de Saúde (OMS), o definiu como “um estado de completo bem-estar físico, mental, social e emocional e não apenas a ausência de doença ou enfermidade” (Fact Sheet WHO/31, 2008).

Dada a importância de um estado geral de saúde deve privilegiar-se a promoção da mesma em detrimento da exclusiva prevenção da doença. A Carta de *Ottawa*, aprovada em 1986, vê este conceito amplificado uma vez que a mesma enfatiza determinados pré-requisitos para a saúde incluindo paz, abrigo, educação, alimentação bem como equidade e justiça social (OMS, 2001). Assim, uma compreensão abrangente do conceito de saúde implica que todos os sistemas e estruturas de gestão de saúde pública tenham em consideração as suas implicações na saúde e bem-estar individual e coletivo (Nutbeam & Muscat, 2021; Watt, 2005).

2. SAÚDE ORAL

De acordo com a Federação Dentária Internacional (FDI), a saúde oral pode ser definida como a capacidade de falar, sorrir, cheirar, saborear, tocar, mastigar, engolir e transmitir um conjunto de emoções através de expressões faciais com confiança e sem dor, desconforto ou doença do complexo craniofacial (Glick et al., 2016). A saúde oral é, portanto, um conceito multidimensional que engloba tanto o bem-estar físico como psicológico, emocional e social, sendo parte integrante da saúde sistémica (Peres et al., 2019).

A saúde oral e a saúde geral apresentam uma relação bidirecional, ou seja, patologias sistêmicas têm a capacidade de afetar a saúde oral e vice-versa. É de destacar as doenças crônicas, como a diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e patologia renal crônica, que apresentam uma forte associação com várias patologias orais uma vez que têm fatores de risco comuns (Dörfer et al., 2017; Petersen, 2003).

Deste modo, as patologias na cavidade oral podem ser classificadas como um problema de saúde pública, considerando-se das doenças mais prevalentes a nível mundial e que afetam mais de 3.5 milhões de pessoas, estando o crescimento populacional e o envelhecimento da população intimamente relacionados com esta tendência crescente. Associado ao envelhecimento populacional existe uma grande falta de acessibilidade a cuidados de saúde oral verificando-se uma preterização da mesma (Chen et al., 2021; Kassebaum et al., 2017; Peres et al., 2019).

De forma a ultrapassar estas problemáticas, em maio de 2021, realizou-se a 74^a Assembleia Mundial da Saúde onde foi estabelecida a necessidade de mudança no paradigma no planeamento das políticas de saúde oral, passando-se de um modelo restaurador para um modelo preventivo. Prevê-se então que todos os indivíduos e comunidades tenham acesso a serviços de saúde essenciais sem dificuldades financeiras, onde devem estar incluídos a promoção da saúde oral e intervenções de prevenção, tratamento e reabilitação. É ainda de referir que um dos objetivos até ao ano de 2030 é a redução do impacto ambiental dos serviços de saúde a nível mundial (OMS, 2022).

As doenças orais devem portanto ser prevenidas e controladas através de três veículos: individual, profissional e comunitário (Petersen, 2003).

3. SAÚDE PERIODONTAL

Segundo a Federação Europeia de Periodontologia (*European Federation of Periodontology* [EFP]) e a Academia Americana de Periodontologia (*American Academy of Periodontology* [AAP]), a saúde periodontal pode ser descrita como a ausência de doença periodontal inflamatória, permitindo o normal funcionamento do indivíduo, evitando consequências mentais ou psicológicas devido a doença atual ou passada (Chapple et al., 2018). Uma definição mais prática de saúde periodontal pode ser caracterizada por um estado livre de inflamação periodontal, ou seja, ausência de

inflamação a nível histológico associada à gengivite ou periodontite e pela inexistência de qualquer alteração anatómica do periodonto. No entanto, deve reconhecer-se que na maioria dos adultos, a combinação destas duas condições é improvável uma vez que o periodonto é uma estrutura altamente dinâmica (Lang & Bartold, 2018). Assim, o termo clinicamente saudável deve ser aplicado quando estamos perante a ausência (ou redução muito significativa) de inflamação periodontal tanto num periodonto intacto como num periodonto reduzido (Lang & Bartold, 2018).

Desta forma, fatores biológicos, ambientais, sistémicos, socioeconómicos e psicológicos podem afetar diretamente a saúde periodontal (Mariotti & Hefti, 2015). É de referir a extrema importância de uma correta e eficaz higiene oral na manutenção da saúde periodontal dado que o biofilme oral é considerado o fator etiológico major da doença periodontal. Assim, a saúde periodontal pode ser alcançada através da combinação de cuidados de higiene do próprio indivíduo e de consultas regulares com profissionais qualificados (Lang & Bartold, 2018).

O periodonto é uma estrutura complexa, sendo esta composta pela gengiva, ligamento periodontal (LPD), cemento e osso alveolar (Figura 1). A principal função do periodonto é o suporte do dente e a sua inserção no osso alveolar, apresentando também uma função protetora contra a microflora patogénica (Kim et al., 2021).

O periodonto sofre alterações fisiológicas e morfológicas ao longo do tempo sendo, portanto, uma estrutura dinâmica que pode diferir consoante a idade. Dado que a destruição do periodonto é, considerada irreversível, a manutenção estrutural e funcional do mesmo é imprescindível (Kim et al., 2021).

Um periodonto saudável é caracterizado pela ausência detetável de inserção e/ou perda óssea, apresentando valores inferiores a 10% relativamente à hemorragia à sondagem e com profundidades de sondagem menores ou iguais a 3 (Chapple et al., 2018).

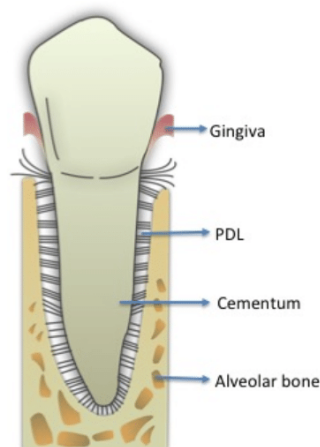


Figura 1 | Figura representativa da constituição do periodonto: gengiva, ligamento periodontal (LPD), cimento e osso alveolar (Adaptado de Perillo et al., 2020).

4. DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal é uma condição que engloba a gengivite e a periodontite (Figura 2), afetando os tecidos que envolvem e suportam os dentes (Nazir et al., 2020). A gengivite encontra-se confinada à mucosa queratinizada e apresenta-se como uma inflamação evidenciada por vermelhidão, edema e hemorragia (Harvey, 2017), devendo-se essencialmente a uma resposta inflamatória gengival devido à acumulação de biofilme dentário entre a superfície do dente e a gengiva (Gasner & Schure, 2022). É uma condição reversível, ou seja, recupera com uma eficaz e correta higiene oral (Gasner & Schure, 2022).

Por outro lado, a periodontite advém da evolução de uma gengivite não controlada, progredindo para uma doença crônica inflamatória e altamente destrutiva dos tecidos moles e duros (ligamento periodontal, cimento e osso alveolar) do complexo periodontal (Harvey, 2017), sendo esta mediada pela disbiose entre a microbiota oral e o sistema imune do hospedeiro (Gasner & Schure, 2022; Sedghi et al., 2021). A perda de tecido periodontal decorre progressivamente e traduz-se clinicamente numa perda de inserção clínica devido à reabsorção de osso alveolar, presença de bolsas periodontais e hemorragia gengival (Li et al., 2021; Peres et al., 2019; Tonetti et al., 2018).

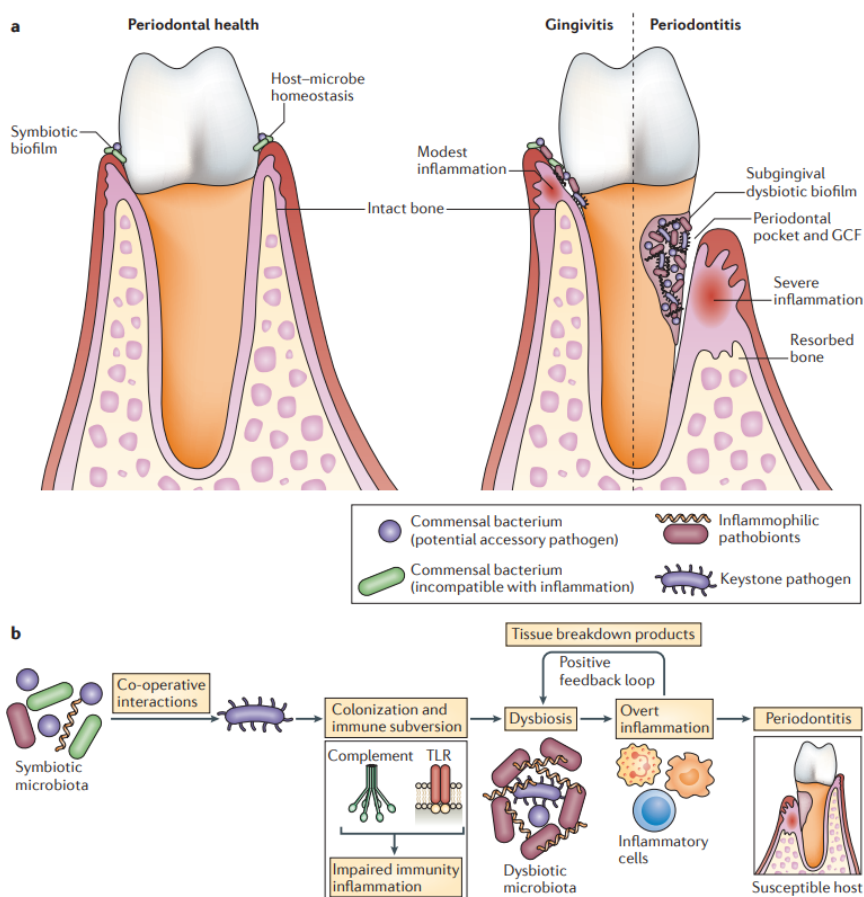


Figura 2 | O mecanismo de disbiose oral pode provocar gengivite e periodontite (Adaptado de Hajishengallis, 2015).

4.1. Epidemiologia e Prevalência

A doença periodontal é a sexta doença mais prevalente a nível global, sendo portanto considerada como um problema de saúde pública e com uma tendência crescente, especialmente nas últimas três décadas (Chen et al., 2021; Kassebaum et al., 2014). Afeta mais de 50% da população adulta, enquanto que a periodontite na sua forma severa afeta até 11% dos adultos, prejudicando a qualidade de vida relacionada com a saúde oral, a auto-estima individual e o bem-estar geral (Dumitrescu, 2016; Kwon et al., 2021).

Num estudo realizado entre 1990 e 2019, verificou-se que a prevalência global de periodontite severa, padronizada por idade, aumentou em 8.44%, sendo que no ano de 2019 existiam 1.1 bilhão de casos da mesma globalmente (Chen et al., 2021). A nível geográfico observa-se que a zona mais afetada corresponde à África Subsariana (19.577

em cada 100.000 pessoas), sendo que tanto a Ásia Ocidental, a Ásia Oriental e a Oceânia apresentam a prevalência mais baixa a nível global (10.060 em cada 100.000 pessoas).

No entanto, a Índia é o país com maior número de casos de periodontite severa (2.2 milhões) (Chen et al., 2021). No que concerne à faixa etária com mais incidência de periodontite severa, observou-se que existe uma maior incidência de casos entre os 40 e 49 anos, sendo ainda importante referir que a população idosa contribui de forma expressiva para o aumento da prevalência de periodontite severa a nível global uma vez que a idade é um fator de risco para a doença em questão (Chen et al., 2021).

Segundo dados do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), entre 2009 e 2014, a periodontite afetava cerca de 42.0% dos adultos nos Estados Unidos da América, sendo que 7.8% dos mesmos apresentavam periodontite severa (Kwon et al., 2021). No continente europeu, apesar da escassez de estudos, a prevalência de periodontite é elevada, verificando-se em França uma prevalência bastante similar à dos Estados Unidos da América, registando-se ainda uma taxa de 76.0% de periodontite severa em adultos com idade entre os 65 e os 74 anos na Alemanha (Michaud et al., 2017).

Em Portugal, a Direção Geral de Saúde (DGS) levou a cabo um estudo epidemiológico, em 2015, onde se observou uma baixa prevalência de periodontite (10.8% nos adultos e 15.3% em idosos), verificando-se uma tendência otimista (DGS, 2015). Recentemente, num estudo realizado no Agrupamento de Centros de Saúde (ACES) Almada-Seixal, em 2019, verificou-se que sete em cada dez adultos apresentavam doença periodontal e seis em cada dez periodontite (Botelho et al., 2019). Globalmente 59.9% da população adulta foi diagnosticada com periodontite nos diversos estádios (leve, moderada e severa), sendo que 22.2% e 24.0% correspondiam a um estádio moderado e severo, respetivamente (Botelho et al., 2019). A amostra deste estudo apresentava um baixo nível de escolaridade, encontrando-se na sua maioria em situação de inatividade laboral, em contrapartida, relataram uma boa frequência de escovagem dentária, hábitos de higiene interproximal e baixo conhecimento acerca da doença periodontal. No que toca ao estado de saúde geral, uma grande percentagem da amostra apresentou comorbilidades, verificando-se uma prevalência de fumadores de 13.60% e de ex-fumadores de 27.50% (Botelho et al., 2019).

Referente ao tema da presente tese, que se foca particularmente no efeito da periodontite na inflamação dos órgãos reprodutores femininos e consequentemente na fertilidade feminina, podemos verificar que existe uma íntima relação entre a doença periodontal e a infertilidade feminina (Machado, Botelho, et al., 2020). Neste sentido, as pacientes do sexo feminino referenciadas para tratamentos de fertilidade apresentaram taxas de 33.30% e 16.70% de periodontite e gengivite, respetivamente (Machado, Botelho, et al., 2020). Num estudo realizado por Chen e colaboradores (2021), e observando-se as faixas etárias correspondentes à idade fértil de uma mulher, verificamos que a periodontite severa pode afetar, entre os 30 e os 40 anos de idade, entre 10.000 a 20.000 pessoas por cada 100.000. No entanto, devemos ter em consideração que nesta amostra também se encontram indivíduos do sexo masculino (Chen et al., 2021).

4.2. Fatores Etiológicos da Periodontite

A periodontite é uma doença crónica inflamatória de origem multifatorial, podendo considerar-se o biofilme dentário como o fator etiológico major da mesma (Kwon et al., 2021).

A microbiota oral representa uma parte fulcral da flora do organismo humano, apresentando uma função protetora contra a colonização de bactérias extrínsecas e intrínsecas, vírus, entre outros microrganismos que podem afetar a saúde sistémica (Arweiler & Netuschil, 2016). Num estado saudável, os vários organismos comensais coexistem em simbiose, no entanto, se existir algum tipo de alteração neste ambiente, pode ocorrer uma disbiose, resultando num crescimento excessivo de componentes de alta virulência, desencadeando a doença periodontal (Arweiler & Netuschil, 2016; Kinane et al., 2017; Lang & Bartold, 2018).

O periodonto encontra-se amplamente protegido por um epitélio especializado, denominado epitélio juncional, altamente vascularizado e que apresenta um fluxo constante de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) que têm a capacidade de transitar para a superfície do dente, inibindo o crescimento do biofilme (Curtis et al., 2011).

A periodontite resulta portanto de uma alteração da homeostase devido a uma alteração do microbioma (Figura 3), onde podemos verificar a existência de bactérias predominantemente anaeróbias Gram-negativas específicas, as bactérias do “complexo vermelho”, onde estão incluídas *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e

Tannarella forsythia, frequentemente observadas em bolsas periodontais (Darveau, 2010; Pan et al., 2019).

São os fatores de virulência destas bactérias, juntamente com os lipopolissacáridos (LPS) presentes nas mesmas, que estimulam os macrófagos do hospedeiro e outras células inflamatórias, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias que apresentam um papel fundamental na modulação da homeostase dos processos inflamatórios (Kwon et al., 2021; Pan et al., 2019). Assim, citocinas pró-inflamatórias como os fatores de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1b) e prostaglandina E2 (PGE2) vão estimular a produção de metaloproteínases (MMPS) através de macrófagos, fibroblastos, células epiteliais juncionais e neutrófilos que vão lesar e destruir as fibras de colagénio dos tecidos periodontais (Kwon et al., 2021).

Desta forma, a progressão da doença periodontal está intimamente relacionada com o papel das citocinas uma vez que estas são moduladores da homeostase e dos processos inflamatórios (Pan et al., 2019). Uma das consequências do aumento destes mediadores inflamatórios é exatamente a reabsorção de osso alveolar, característica da periodontite, e que é regulada pela dificuldade na ligação do fator nuclear K (*Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand* [RANKL]) ao recetor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) (Darveau, 2010).

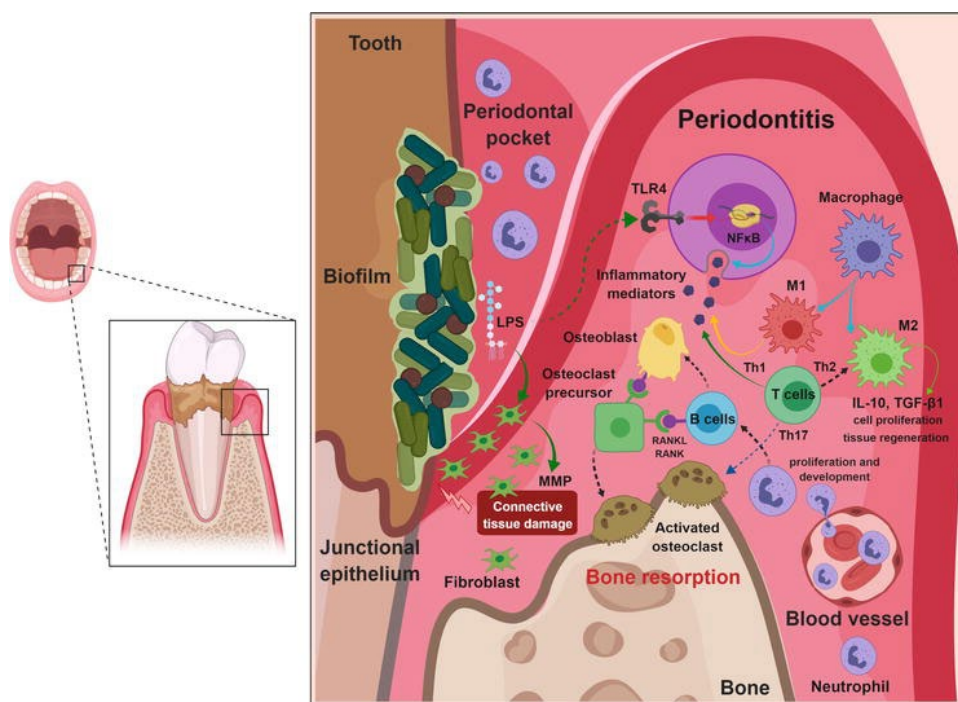


Figura 3 | Mecanismo biológico da doença periodontal (Adaptado de Muñoz-Carrillo et al., 2020).

4.3. Fatores de Risco da Periodontite

Existem vários fatores que podem contribuir para uma maior propensão ao desenvolvimento e progressão da doença periodontal. Fatores como presença de placa bacteriana supra e subgengival, anomalias anatómicas na forma ou posição do dente ou fatores iatrogénicos tais como restaurações debordantes podem levar a uma maior possibilidade de desenvolvimento de doença periodontal (Knight et al., 2016).

Atualmente é de consenso geral que também o estilo de vida e os fatores ambientais e económicos podem ter um impacto significativo na manifestação clínica da periodontite (Bartold, 2018). Fatores como a idade do indivíduo (Ebersole et al., 2016; Eke et al., 2016), o nível de escolaridade/educação (Eke et al., 2015), stress psicológico (Botelho et al., 2018), obesidade e síndrome metabólico, osteoporose e presença de cálcio e vitamina D na dieta (Genco & Borgnakke, 2013) podem levar a uma maior propensão para o desenvolvimento da doença. O consumo de tabaco encontra-se fortemente relacionado com a alteração da microbiota bem como das respostas inflamatórias do hospedeiro, afetando ainda de forma negativa o resultado do tratamento tanto da doença periodontal quanto de condições peri-implantares, devendo ter-se em conta que o consumo excessivo de álcool tem a capacidade de exacerbar os efeitos adversos do tabaco (Bartold, 2018).

Por outro lado, o impacto económico da periodontite reflete-se em custos diretos e indiretos, estando o primeiro relacionado com o tratamento propriamente dito e o último com as consequências que esta doença pode provocar, bem como a perda de produtividade devido à incapacidade de trabalhar. Assim, no ano de 2018, verificou-se um gasto aproximado de 154.06 biliões de dólares nos Estados Unidos da América e de 158.64 biliões de euros em 32 países Europeus pelo que podemos concluir que a periodontite apresenta um elevadíssimo impacto a nível económico (Botelho et al., 2022).

Também as condições sistémicas podem ter impacto no periodonto e cooperar no desenvolvimento da doença, isto é, algumas alterações sistémicas podem ter um efeito direto na inflamação periodontal através da alteração da resposta imune do hospedeiro à infeção periodontal, levando a perda de inserção periodontal e de osso alveolar (Albandar et al., 2018).

4.4. Manifestações Sistêmicas da Periodontite

A periodontite e a saúde sistêmica encontram-se intimamente relacionadas (Cecoro et al., 2020). A deterioração do periodonto durante a fase ativa da doença permite, por um lado, a invasão de patógenos periodontais na corrente sanguínea e, por outro, ativa o sistema imunitário inato e adaptativo, desencadeando-se uma reação inflamatória sistêmica (Cekici et al., 2014). Assim, é através da circulação sistêmica que a periodontite pode provocar efeitos em órgãos e estruturas que se encontram à distância (Cecoro et al., 2020) (Figura 4).

Comparando indivíduos periodontalmente saudáveis com doentes com periodontite severa verifica-se que os diagnosticados com a doença apresentam níveis de mediadores pró-inflamatórios, como proteína C reativa (PCR) (Machado et al., 2021), IL-1 β , PGE2, TNF- α (Cecoro et al., 2020), leucócitos (Botelho et al., 2021), IL-1, IL-6, fibrinogénio e contagem de neutrófilos no sangue aumentados (Hajishengallis & Chavakis, 2021).

A inflamação sistêmica associada à periodontite advém da disseminação hematogénica de bactérias periodontais ou do extravasamento de mediadores inflamatórios dos tecidos periodontais para a corrente sanguínea, podendo causar bacterémias (Hajishengallis & Chavakis, 2021). A presença de inflamação em localizações extra-orais pode também ser induzida por via orofaríngea ou oro-digestiva, estando a primeira relacionada com a pneumonia aspirativa e a segunda com a disbiose intestinal e inflamação sistêmica (Hajishengallis & Chavakis, 2021).

Por conseguinte, é plausível a hipótese de que a inflamação local provocada pela periodontite se pode estender a nível sistémico influenciando a carga inflamatória do indivíduo e vice-versa, ou seja, a inflamação sistêmica também pode afetar a saúde periodontal (Cecoro et al., 2020). Recentemente foi introduzido o conceito de inflamação de baixo grau (*low-grade inflammation* [LGI]) que se caracteriza por uma produção crónica de baixo grau de mediadores inflamatórios. Assim, a LGI é reconhecida como um fator de risco para inúmeras patologias crónicas, incluindo doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e tumorais (Cecoro et al., 2020).

Existem inúmeras patologias e condições sistêmicas associadas à periodontite nomeadamente a diabetes mellitus (Preshaw et al., 2012), hipertensão arterial (Muñoz

Aguilera et al., 2020), doenças cardiovasculares, cancro (Michaud et al., 2017), doenças hematológicas (Botelho et al., 2021), obesidade (Genco & Borgnakke, 2013), artrite reumatóide (Hussain et al., 2020) e lúpus sistémico eritematoso (Hussain et al., 2022). É ainda importante referir, e indo de encontro ao tema desta tese, que a inflamação sistémica inerente à periodontite está associada a efeitos na fertilidade feminina (Fogacci et al., 2016) e a *outcomes* negativos da gravidez (Zhang et al., 2022).

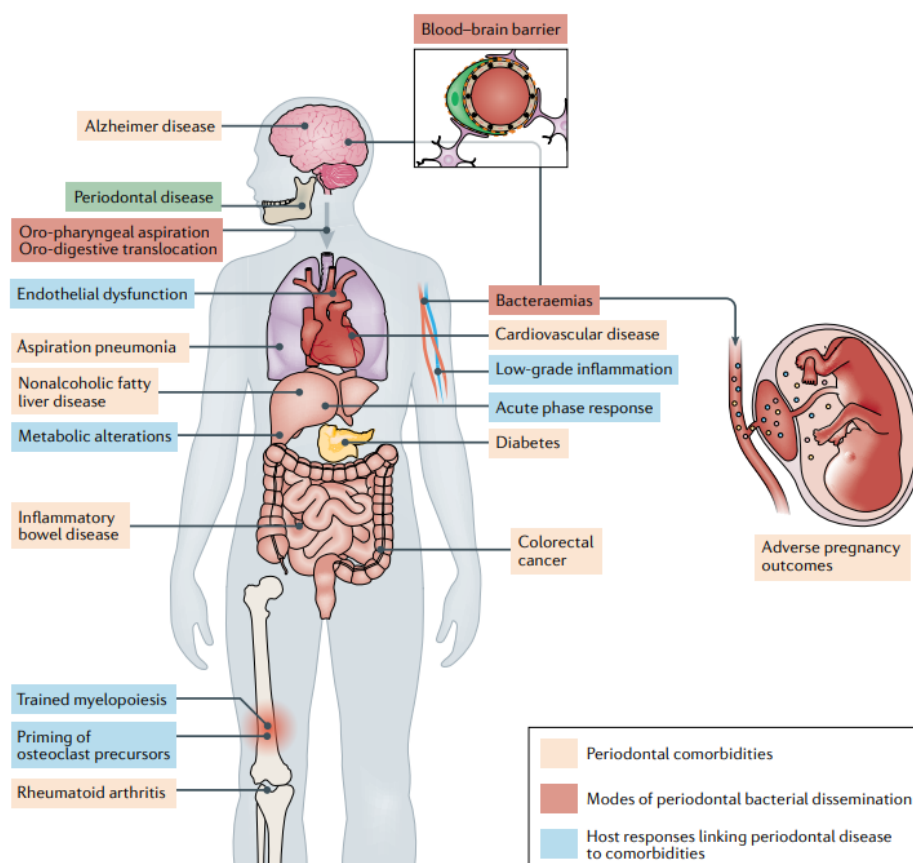


Figura 4 | A doença periodontal encontra-se fortemente associada a outras patologias sistémicas (Hajishengallis & Chavakis, 2021).

4.4.1. Associação da Periodontite com Patologias do Sistema Reprodutor Feminino

A manutenção da saúde oral e periodontal é preponderante durante a idade reprodutiva da mulher (Yildiz Telatar et al., 2021), uma vez que a doença periodontal e a inflamação sistémica inerente à mesma podem ter um grande impacto na fertilidade feminina (Fogacci et al., 2016; Machado, Lopes, et al., 2020). Ao longo dos últimos anos

têm sido colocadas várias hipóteses que expliquem esta associação, sendo de consenso geral que a inflamação sistêmica de baixo grau associada à periodontite tem efeitos nos tecidos do endométrio (Johnson et al., 2010).

De acordo com a OMS, a infertilidade pode ser definida como a incapacidade de estabelecer uma gravidez após 12 meses de relação sexual desprotegida ou devido à diminuição da capacidade reprodutora de um indivíduo, seja individual ou com o seu parceiro (Zegers-Hochschild et al., 2009).

O mecanismo biológico inerente à inter-relação entre a periodontite e a infertilidade poderá estar relacionado com o aumento das citocinas pró-inflamatórias sistêmicas e consequentemente uma diminuição do nível das citocinas anti-inflamatórias (Hajishengallis & Chavakis, 2021). Neste sentido, as citocinas pró-inflamatórias e o stress oxidativo alteram o ciclo de ovulações, a produção de hormonas esteróides, como o estrogénio e a progesterona e a ovulação propriamente dita (Snider & Wood, 2019). As citocinas da família da IL-1 encontram-se em destaque uma vez que reduzem a libertação de hormonas necessárias à ovulação, reduzindo, consequentemente, a fertilidade feminina (Fogacci et al., 2016). Paralelamente, a inflamação e o stress oxidativo são também considerados fatores que prejudicam a maturação meiótica e citoplasmática do oócito (Snider & Wood, 2019).

A periodontite aparentemente pode estar relacionada com outras patologias como síndrome dos ovários policísticos (Machado, Escalda, et al., 2020), endometriose (Thomas et al., 2018) e vaginose bacteriana (Escalda et al., 2021). Como referido anteriormente, a periodontite encontra-se ainda associada a *outcomes* negativos da gravidez possíveis de observar na Figura 5, tais como baixo peso à nascença (*low birth weight* [LBW]) (Manrique-Corredor et al., 2019), nascimentos prematuros (*preterm birth* [PTB]) e ainda tamanho pequeno para a idade gestacional dos recém-nascidos (*small for gestational age* [SGA]) (Zhang et al., 2022). Apesar das evidências apontarem para uma associação, o mecanismo biológico ainda não está devidamente explicado.

No que toca aos efeitos da periodontite sobre órgãos reprodutores femininos, a literatura é escassa. Neste sentido, os modelos animais assumem uma importância preponderante na medida em que permitem avaliar e esclarecer os mecanismos biológicos inerentes à periodontite bem como a sua interligação com patologias sistêmicas (Rojas et al., 2021).

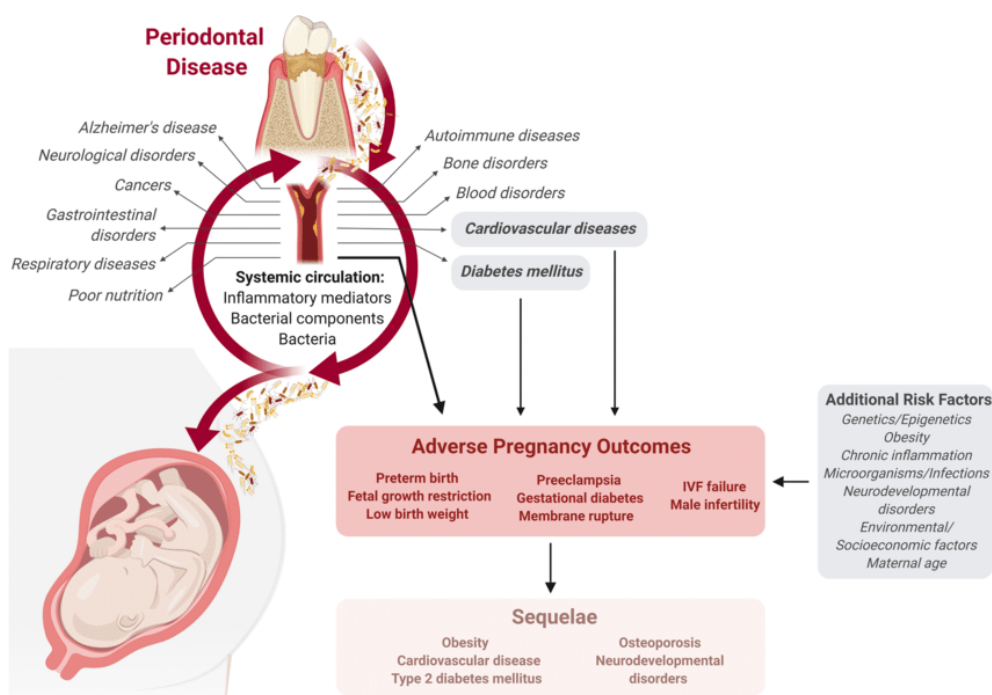


Figura 5 | A periodontite encontra-se associada a *outcomes* negativos da gravidez (Pessolano et al., 2020).

5. IMPORTÂNCIA DOS MODELOS ANIMAIS NO ESTUDO DA PERIODONTITE

O estudo da patofisiologia da periodontite constitui um desafio dada a sua natureza multifatorial. Assim, devido à variabilidade humana e às limitações éticas associadas aos estudos em humanos, o estudo da periodontite através de modelos animais é cada vez mais recorrente (de Molon et al., 2018; Rojas et al., 2021).

Ao longo dos últimos anos, com o objetivo de aprofundar o conhecimento acerca da periodontite, têm sido desenvolvidos diversos estudos em modelos animais com os mais variados *outcomes* (Graves et al., 2012). Este tipo de modelos apresenta a vantagem de conseguir mimetizar os processos que ocorrem no ser humano, isto é, *in-vivo*. No entanto, os modelos animais apresentam algumas limitações, sendo que na maioria das vezes são menos relevantes do que as que são encontradas em estudos *in-vitro*, nos quais as células são tipicamente alvo de estudo numa superfície plástica (Graves et al., 2012).

Os roedores partilham com o ser humano características referentes à doença periodontal, tais como a colonização bacteriana e a suscetibilidade para a periodontite experimentalmente induzida (de Molon et al., 2016). Através destes modelos animais é possível esclarecer os mecanismos biológicos associados à periodontite bem como testar

possíveis terapêuticas relevantes no tratamento da mesma (Abe & Hajishengallis, 2013). Uma grande parte destes estudos não inclui a indução de periodontite propriamente dita mas sim a introdução via subcutânea, intravenosa ou intra-amniótica de patógenos periodontais ou dos seus sub-produtos, verificando-se níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias (Suh et al., 2019), inflamação uterina e contagem de leucócitos aumentada no líquido amniótico e no sangue arterial umbilical (Fogacci et al., 2016).

Outras vantagens estão relacionadas com fatores económicos, fácil manuseamento do modelo animal, curto período de gestação e desenvolvimento de um processo inflamatório periodontal altamente reprodutível (Rojas et al., 2021).

5.1. Métodos de Indução de Periodontite em Ratos

Existem vários métodos de indução de periodontite descritos na literatura, tais como utilização de sonda esofágica (Marchesan et al., 2018; Rojas et al., 2021), injeção de lipopolissacarídeo (LPS) (Graves et al., 2012; Pereira et al., 2019; Rojas et al., 2021), inoculação oral e retal de periodontite, inoculação periodontal de antígenos bacterianos isolados, indução química, método calvário (Rojas et al., 2021), infeção bacteriana com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) e ligaduras colocadas abaixo do ponto de contacto em dentes molares (Pereira et al., 2019; Rojas et al., 2021; Suh et al., 2019).

A indução de periodontite através de sonda esofágica consiste na inoculação de uma bactéria humana no animal (Marchesan et al., 2018). As bactérias mais comumente utilizadas são *Porphyromonas. Gingivalis* (*P. Gingivalis*), *A. actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) ou combinações de várias estirpes bacterianas (Rojas et al., 2021). A principal limitação desta técnica é a falta de previsibilidade na magnitude da perda óssea quando comparada com o método de ligadura nos molares (Marchesan et al., 2018; Rojas et al., 2021). Este fator está dependente da bactéria utilizada bem como do tipo de roedor, o que sugere que a interação do hospedeiro e os fatores microbianos determinam o início e a progressão da doença (de Molon et al., 2016). Assim, este método foi estabelecido como não totalmente eficaz na indução de periodontite (Rojas et al., 2021).

A indução de periodontite através de injeção de LPS é realizada diretamente na gengiva interproximal do palato, entre o primeiro, o segundo e o terceiro molares superiores (Rojas et al., 2021). Este método provoca um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (Suh et al., 2019), migração apical do epitélio juncional e ativação da osteoclastogénese (Rojas et al., 2021), resultando numa reabsorção óssea alveolar (Graves et al., 2012). A principal vantagem é o controlo sobre o estímulo patogénico dado não existir a variável colonização (Graves et al., 2012). No entanto, é necessário um regime de injeção bastante repetitivo, em média de 2 a 3 vezes por semana (Rojas et al., 2021). Além disso, este método promove uma baixa inflamação sistémica e reabsorção alveolar quando comparada com o método de ligadura, conferindo-lhe portanto uma limitação (Rojas et al., 2021).

O método de inoculação de periodontite via oral e retal é caracterizado por uma aplicação tópica, pelo que apresenta a vantagem de minimização de trauma da mucosa e de ser passível de ser administrado sem anestesia, promovendo uma inflamação periodontal e uma reabsorção óssea alveolar compatível com uma periodontite crónica (Rojas et al., 2021). Como limitações verifica-se a possibilidade de estarmos perante uma disbiose intestinal/fecal e não propriamente associada a periodontite (Rojas et al., 2021).

Em relação à técnica de indução química de periodontite esta pode ser conseguida através da ingestão oral de ácido 2,4,6-trinitrobenzóico (TNBS) e/ou de dextran sulfato de sódio (DSS). Apresenta a vantagem de não necessitar de anestesia, no entanto, tem como grande limitação o facto de não promover a interação bactéria-hospedeiro característica da periodontite pelo que não é considerado um bom método de indução da doença (Rojas et al., 2021).

No método de inoculação calvária de periodontite verifica-se uma inoculação subcutânea, frequentemente *P. gingivalis*, entre as orelhas e os olhos do roedor (Rojas et al., 2021). Apresenta como vantagens o facto de promover uma inflamação subcutânea aguda e uma rápida absorção óssea alveolar (Marchesan et al., 2018).

Relativamente à infeção bacteriana com *A. actinomycetemcomitans*, é de ter em consideração que esta apresenta uma capacidade bastante diminuta em aderir a superfícies pelo que pode existir dificuldade em conseguir que ocorra infeção (Graves et al., 2012). Em estudos realizados com *A. actinomycetemcomitans*, com fins de determinação de reabsorção óssea e resposta sistémica do hospedeiro à infeção, verificou-se uma elevada contagem de linfócitos, células B e CD4, IL-2, IL-1 e TNF- α , observando-se ainda perda óssea (Graves et al., 2012).

Assim, verifica-se que embora existam diversos métodos de indução de periodontite a maioria apresenta um grande número de limitações (Rojas et al., 2021). A técnica que melhor mimetiza a periodontite e os seus mecanismos moleculares em seres humanos é através da colocação de ligaduras nos dentes molares (de Molon et al., 2018; Fogacci et al., 2016).

A indução de periodontite através de ligaduras consiste na colocação de ligaduras, sejam estas de seda, *nylon* ou algodão, em redor dos dentes molares do roedor (Figura 5) (Rojas et al., 2021). Deste modo, assiste-se a uma maior retenção de placa bacteriana, o que estimula a colonização bacteriana e consequentemente a que se verifiquem condições semelhantes às observadas em doentes periodontais humanos (de Molon et al., 2018). A interação bactéria-hospedeiro observada com este método é compatível com o paradigma atual observado na patogénese da periodontite, em que a existência de uma disbiose provoca uma resposta imune de destruição óssea (Rojas et al., 2021).

Este método de indução da doença é considerado o que melhor mimetiza a periodontite e os seus mecanismos moleculares em seres humanos (Figura 6) (Gao et al., 2022; Pereira et al., 2019). Apresenta várias vantagens quando comparada com outras técnicas de indução de doença periodontal uma vez que requer equipamentos menos especializados, não necessita de uma técnica para o cultivo de bactérias anaeróbias e pode levar à rápida indução da doença, levando a uma perda óssea previsível e localizada, para além de apresentar um baixo custo e manipulação eficiente (Fogacci et al., 2016; Lin et al., 2021; Pereira et al., 2019). No entanto, apresenta algumas desvantagens tais como a complexa técnica da colocação da ligadura devido ao pequeno tamanho da cavidade oral dos roedores (Rojas et al., 2021), possibilidade de perda espontânea da ligadura durante o tempo experimental (Lin et al., 2021; Pereira et al., 2019) ou trauma da mucosa (Marchesan et al., 2018). De forma a ultrapassar estas dificuldades, são necessários operadores experientes e qualificados (Rojas et al., 2021). Quando comparadas as técnicas de ligadura e de indução de periodontite por LPS verifica-se que a segunda está associada a uma ativação tardia das vias de sinalização quando comparadas com o modelo de ligadura (Garcia de Aquino et al., 2009).

Na utilização deste protocolo de indução de periodontite verificam-se condições clínicas características da periodontite tais como inflamação do tecido gengival (de Molon et al., 2018; Fogacci et al., 2016; Rojas et al., 2021) e perda óssea significativa a partir do 6º dia de procedimento (de Molon et al., 2018; Rojas et al., 2021). A partir do 6º dia e até ao 12º dia observou-se uma absorção óssea progressiva devido à ativação da

osteoclastogênese por parte do hospedeiro (Marchesan et al., 2018). Por outro lado, existe um aumento expressivo no número de citocinas pró-inflamatórias (nomeadamente o $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6) (Suh et al., 2019) e de citocinas ósseas (nomeadamente o RANKL e osteoprotegerina [OPG]) associadas à reabsorção óssea (de Souza et al., 2011). A nível histológico, observa-se uma diminuição do número de fibroblastos e na densidade de colagénio presente no tecido conjuntivo (de Souza et al., 2011). A nível sistémico, existe um aumento dos fatores de inflamação aquando da indução de periodontite com recurso a ligaduras (Suh et al., 2019).

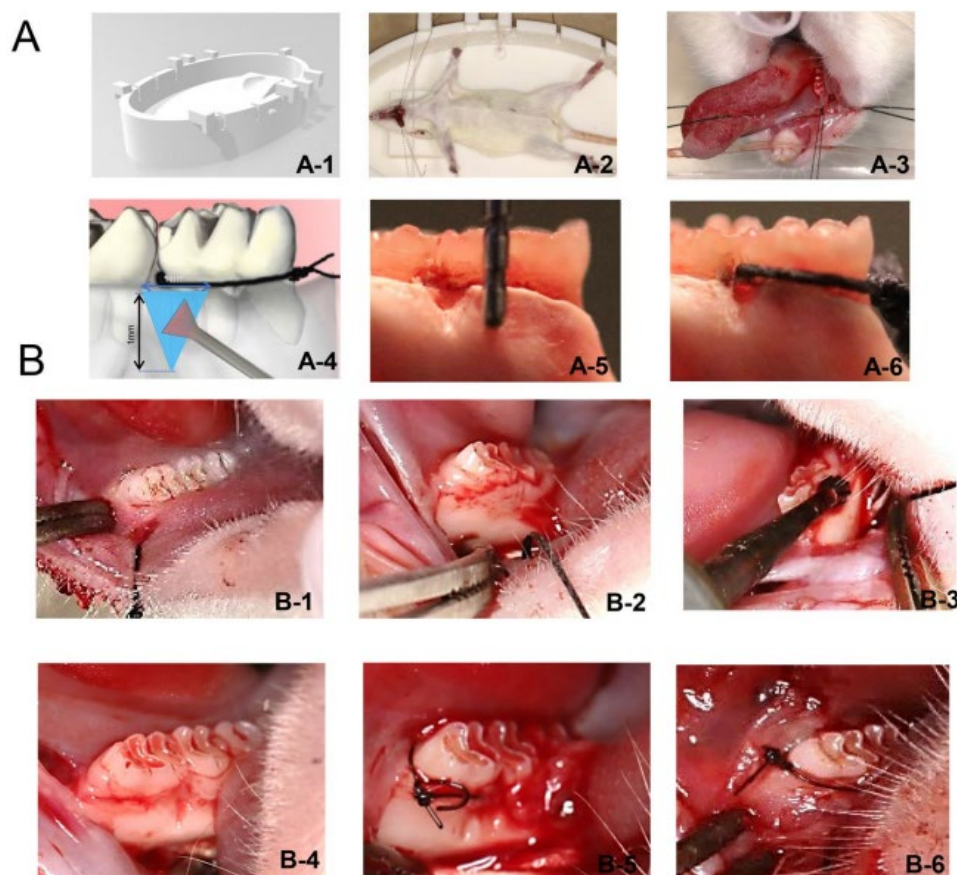


Figura 6 | Colocação de ligadura como método de indução de periodontite (Gao et al., 2022).

5.1.1. Estudos em animais relacionando a periodontite com patologias inflamatórias sistêmicas

Em relação aos estudos acerca da periodontite e a sua associação com patologias sistêmicas estes sugerem uma íntima relação devido à inflamação sistêmica inerente à instalação da doença (Suh et al., 2019).

Diferentes estudos mostram uma estreita relação entre a inflamação associada à periodontite e as doenças vasculares ateroscleróticas (Rojas et al., 2021). Num estudo realizado através da injeção de LPS de *P. gingivalis* em ratos saudáveis, verificou-se a presença de níveis elevados de células inflamatórias circulantes, estando os níveis séricos de IL-6 aumentados (Leira et al., 2020), assemelhando-se portanto ao que se observou num outro estudo, realizado por Rojas e colaboradores (2021), que utilizou o mesmo método de indução da doença mas desta vez em murganhos apresentando uma hiperlipidemia e em que se verificou um desenvolvimento de placas ateroscleróticas.

Estudos em modelos animais demonstram ainda uma associação entre a periodontite e patologias hepáticas. Vasconcelos e colaboradores (2017), induziu periodontite através do método de ligadura e verificou efeitos sistêmicos nos tecidos hepáticos, nomeadamente esteatose microvesicular. O mecanismo biológico sugerido pelos autores prende-se ao aumento do stress oxidativo e peroxidação lipídica devido à diminuição de pericitos (Vasconcelos et al., 2017).

A relação entre a diabetes mellitus com a periodontite também foi explorada em modelos animais, sendo de consenso geral que apresentam uma relação bidirecional (Lalla & Papapanou, 2011). Lalla e Papapanou (2011) verificaram que a diabetes mellitus conduz a um aumento da degradação dos tecidos periodontais, reduzindo a quantidade de colagénio presente nos mesmos (Lalla & Papapanou, 2011).

Referente ao tema desta tese, Fogacci e colaboradores (2016), num estudo envolvendo 40 ratos fêmea, refere que a inflamação sistêmica induzida pela periodontite interfere na fertilidade das fêmeas. Neste estudo, verificou-se que dos 27 animais do grupo experimental, em que foi induzida a doença, apenas 11 conseguiram engravidar numa primeira tentativa. Posteriormente, foi realizada uma segunda tentativa e aqui os resultados são ainda mais flagrantes uma vez que de 16 animais apenas 1 conseguiu engravidar. Por outro lado, no grupo controlo, dos 13 animais existentes apenas 1 não engravidou após as duas tentativas, mostrando que existe uma relação entre a periodontite e a fertilidade ainda pouco esclarecida (Fogacci et al., 2016).

Uma vez que se verifica uma escassez de literatura relativamente aos efeitos e consequências da indução de periodontite na inflamação sistémica e, mais especificamente, nos órgãos reprodutores femininos, a presente tese tem como objetivo avaliar a plausibilidade biológica da possível associação entre a periodontite e as alterações histopatológicas e inflamatórias nos órgãos reprodutores femininos em modelo animal de roedor.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Ética

O presente estudo insere-se no projeto “*Periodontal Health and Fertility in Rats*” (PETIT). A experiência foi realizada nas instalações do Biotério do Campus do Lumiar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (Portugal), um laboratório de roedores de referência nacional e licenciado onde todos os protocolos experimentais são conduzidos de acordo com a Direção Geral de Medicina Veterinária e Alimentar (DGAV).

O presente projeto foi previamente avaliado e aprovado pela Comissão de Ética do Órgão Responsável pelo Bem-Estar Animal (ORBEA – anexo 1), sendo posteriormente ratificado pela comissão de Ética Egas Moniz (processo nº 68/22 – anexo 2).

2.2. Caracterização da Amostra

A Figura 7 apresenta a forma como a amostra do estudo (14 modelos animais) está distribuída no seguimento desta investigação. Assim, num total de 14 animais, 4 pertencem ao grupo controlo e nos restantes é realizado um protocolo de indução de periodontite de 21 dias (5 Ratos Wistar) e outro de 28 dias (5 Ratos Wistar).

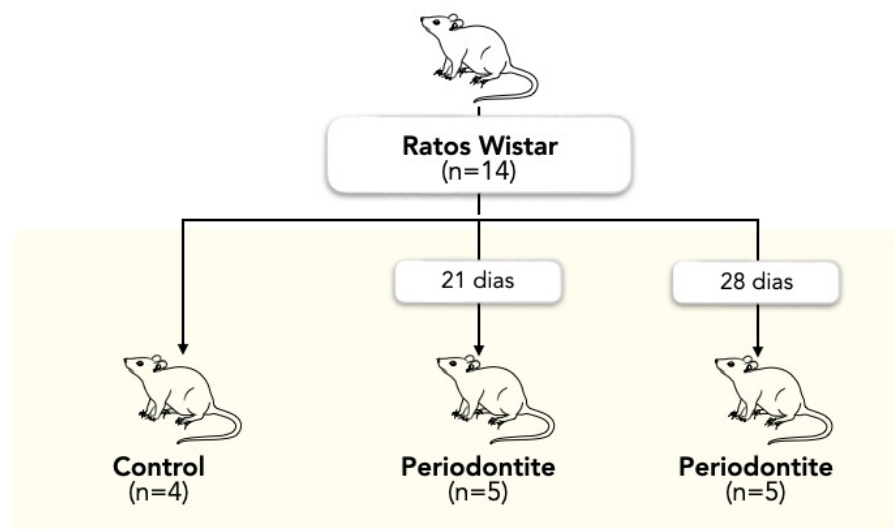


Figura 7 | Amostra do estudo – grupo controlo e grupo experimental.

2.3. Cuidado Animal

O presente estudo incidiu sobre catorze ratos fêmeas Wistar, sistemicamente saudáveis, de 12 semanas de idade, com peso entre 217.00-257.80 gramas. Os animais foram alojados em gaiolas em grupos de 4 e 5 ratos, num ambiente estável e controlado (temperatura de 23°C, com uma humidade relativa do ar de 40%, ciclo claro-escuro de 12 horas) e com livre acesso a alimento e água.

2.4. Indução de Periodontite

Os ratos fêmea foram distribuídos de forma aleatória num grupo controlo e num grupo experimental. Todos os animais do grupo de indução de periodontite foram anestesiados com cetamina a 100mg/kg e xilazina intraperitoneal a 10mg/Kg, numa proporção de 2:1, previamente à colocação de ligaduras.

Foram definidos previamente dois protocolos de durações distintas, um de 21 dias e outro de 28 dias. A indução de periodontite foi realizada através da colocação de ligadura de seda 5-0 ao redor do segundo molar superior bilateral (Abe & Hajishengallis, 2013). A sutura foi introduzida e fixada suavemente para evitar danos periodontais e orais. No protocolo de 28 dias, o posicionamento das ligaduras foi avaliado 15 dias após a colocação inicial, sendo os ratos submetidos a anestesia como anteriormente referido. As ligaduras permaneceram em todos os ratos ao longo de todo o período experimental.

Aos 21 e 28 dias os animais foram novamente anestesiados, como referido anteriormente, e foram eutanasiados através de deslocação cervical. De seguida, uma parte da maxila foi processada e analisada para análise macroscópica e a outra foi processada e analisada para análise para análise macroscópica.

2.5. Processamento e Análise Macroscópica da Reabsorção Óssea Alveolar

Com o objetivo de verificar se a indução de periodontite levou à reabsorção óssea alveolar foi medida macroscopicamente a perda óssea alveolar nas superfícies vestibular e palatina dos molares maxilares (de Molon et al., 2018).

As amostras foram colocadas em peróxido de hidrogénio a 3% durante 24 horas de modo a facilitar a remoção dos tecidos periodontais moles remanescentes. De seguida as amostras foram colocadas em etanol (70%) até que seguissem para avaliação

macroscópica (de Molon et al., 2018). As amostras de osso foram retiradas e foram secas, e, em seguida, as mesmas foram submersas em azul de metileno (0.7 g/L) durante cerca de cinco minutos e posteriormente lavadas abundantemente com água (de Molon et al., 2018).

Através da utilização de um estereomicroscópio com ampliação de 20x foram obtidas fotografias das superfícies vestibular e palatina previamente coradas. A distância da junção amelocementária (JAC) à crista óssea alveolar foi medida em seis localizações nos segundos molares (mésio-vestibular, centro-vestibular, disto-vestibular, mésio-palatino, centro-palatino e disto-palatino) (de Molon et al., 2018) através do programa ImageJ (<https://imagej.net/ij/index.html>).

2.6. Processamento e Análise Histológica

Os órgãos reprodutores femininos (útero, ovários e trompas de Falópio) e as amostras de tecido da maxila foram recolhidos e fixados em formol tamponado a 10%. As amostras foram posteriormente seccionadas e embebidas em parafina, obtendo-se cortes de 5 µm de espessura. De seguida, foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histológica (de Molon et al., 2018), por um avaliador especializado e blindado. As amostras acima referidas foram pontuadas tanto para a inflamação como para a necrose.

Relativamente à condição inflamatória, os tecidos foram avaliados consoante o número de células inflamatórias (células polimorfonucleares e mononucleares) presentes por campo de 40x de ampliação. Utilizou-se o seguinte sistema de pontuação: 1 (nenhuma) para menos de 10 células inflamatórias, 2 (leve) entre 10 a 50 células inflamatórias, 3 (moderado) entre 51 a 100 células inflamatórias, e 4 (grave) quando se observaram mais de 100 células inflamatórias (Tabela 1).

No que toca à necrose, os tecidos foram avaliados com uma ampliação de 10x e a pontuação numérica foi atribuída de acordo com a extensão da camada de tecido necrótico. Utilizou-se o seguinte sistema de pontuação: 1 (nenhum) 0-25%, 2 (leve) 25-50%, 3 (moderado) 50-75% e 4 (grave) 75-100% (Tabela 1).

Tabela 1 | Tabela de pontuação para a inflamação e necrose.

SCORE	INFLAMAÇÃO (Nº de Células Inflamatórias)	NECROSE (%)
1 (Nenhum)	<10	0 a 25
2 (Leve)	10 a 50	26 a 50
3 (Moderada)	51 a 100	51 a 75
4 (Grave)	>100	76 a 100

2.7. Análise Sanguínea

Aos 21 e 28 dias de experiência, cada grupo experimental e respectivos controles foram anestesiados como supramencionado e realizou-se a abertura da cavidade torácica de cada animal com bisturi e, utilizando uma agulha de calibre 22, realizou-se a colheita de cerca de 4000 µL de sangue venoso através de punção no ventrículo esquerdo. As amostras de sangue foram colocadas em dois tipos de tubos: 1) tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 2) tubo de gel (Vacutainer), e seguidamente, foram processadas e analisadas por um técnico de análises clínicas da Joaquim Chaves Saúde experiente e blindado.

Os níveis séricos de vários parâmetros sanguíneos utilizando tecnologias distintas: Citometria de Fluxo Fluorescente e Metodologia de SAFLAS para a determinação da percentagem de neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos e contagem de IgA, IgM e IgG com os reagentes Lysercell® WDF e Fluorocell WDF; Citometria de Fluxo Fluorescente para a contagem diferencial de leucócitos e imunoglobulinas (IG), contagem de eritrócitos (RBC), contagem de plaquetas (PLT); Impedância e Foco Hidrodinâmico para a determinação da contagem de plaquetas (PLT), contagem de eritrócitos (RBC) e (HCT), através do Método de Sulfato Lauril de Sódio, livre de cianeto. O equipamento utilizado para a realização do hemograma foi o Sysmex XN10.

2.8. Análise Estatística

As variáveis contínuas recolhidas para a perda de osso alveolar e o nível inflamatório histológico do periodonto e nos órgãos reprodutores femininos foram estimadas e comparadas às médias e desvio-padrão, dos grupos controlo e dos grupos experimentais de 21 dias e 28 dias de indução de periodontite através de ligaduras.

Para as análises sanguíneas, a análise estatística foi realizada usando o software R Studio. As estimativas das variáveis de interesse foram obtidas por bootstrap ($n=10\,000$), técnica de reamostragem que permite estimar a distribuição amostral uma vez que a amostra de animais é pequena. Adicionalmente, o teste estatístico análise de variância (ANOVA) foi aplicado para avaliar a significância das diferenças entre os grupos. Seguidamente realizou-se a análise emparelhada em grupo análises distintas: 1) do grupo experimental dos 21 dias com o respetivo grupo controlo de 21 dias; 2) do grupo experimental dos 28 dias com o respetivo grupo controlo de 28 dias; e 3) do grupo experimental dos 21 e 28 dias. Adotou-se o nível de significância de 0.05, considerando-se estatisticamente significativos os valores de p abaixo desse limite.

III.RESULTADOS

3.1. Análise Macroscópica da Reabsorção Óssea Alveolar

Com o objetivo de perceber se a periodontite levou à reabsorção óssea alveolar foram obtidas fotografias das superfícies vestibulares e palatinas (Figura 8). Seguidamente, foi medida a distância da JAC à crista óssea alveolar em seis localizações nos segundos molares maxilares.

Comparando os resultados do grupo controlo e do grupo experimental observa-se que os valores do último se encontram substancialmente aumentados em ambos os protocolos de 21 e 28 dias (Figura 9 e Tabela 2).

Relativamente ao protocolo de indução de periodontite de 21 dias, e comparando com o respetivo controlo, é possível observar que, no grupo experimental, a localização com maior perda de osso alveolar é a disto-vestibular (0.67 ± 0.17 vs 0.24 ± 0.07), seguida da disto-palatina (0.65 ± 0.09 vs 0.22 ± 0.07). Por outro lado, a zona com menor perda de osso alveolar foi a centro-vestibular (0.47 ± 0.21 vs 0.25 ± 0.02).

No que concerne ao protocolo de 28 dias comparando com o respetivo controlo (Figura 10), a localização com maior perda óssea alveolar é, em concordância com o protocolo de duração inferior, a disto-vestibular (0.58 ± 0.34 vs 0.26 ± 0.02). As outras localizações apresentaram medições inferiores e semelhantes entre si (0.44 ± 0.11 ; 0.46 ± 0.24 ; 0.46 ± 0.10 ; 0.47 ± 0.14).

Além disso, quando comparados os dois protocolos de indução de periodontite em roedores em termos de perda óssea total, os resultados do protocolo de 21 dias são mais expressivos, isto é, observa-se uma maior reabsorção óssea alveolar (0.57 ± 0.15 vs 0.49 ± 0.19).

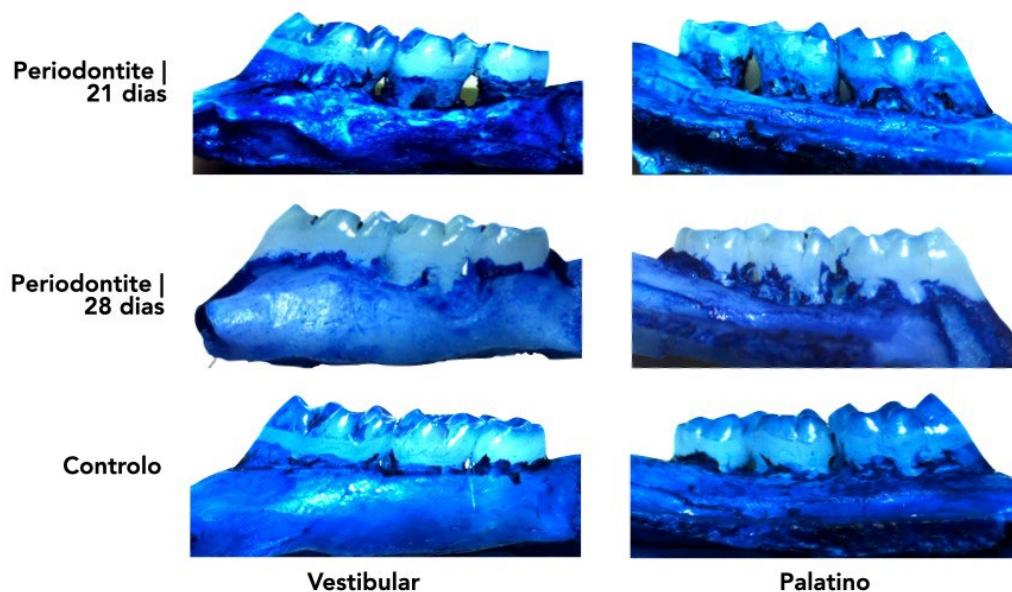


Figura 8 | Fotografias das superfícies vestibular e palatina obtidas através do estereomicroscópio referentes a ambos os protocolos (21 e 28 dias).

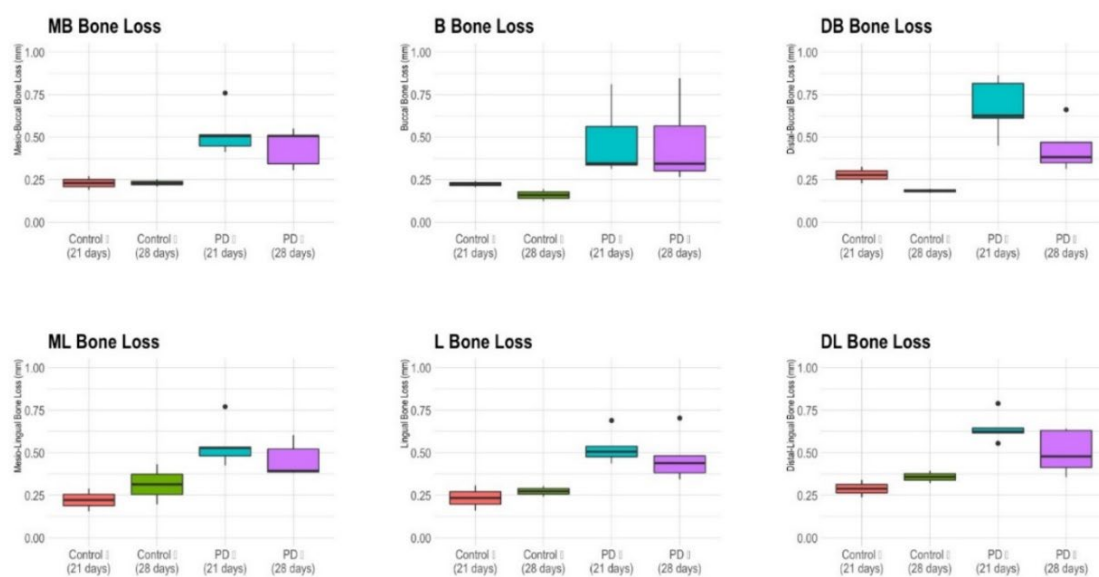


Figura 9 | Gráfico representativo da perda óssea alveolar por localização nos grupos experimentais e nos grupos controlo.

Tabela 2 | Média dos resultados da perda óssea alveolar por localização e total, e respetivo desvio padrão.

Grupo	Média ± Desvio Padrão						
	MV	V	DV	ML	L	DL	Total
PD21	0.53 ± 0.14	0.47±0.21	0.67±0.17	0.55±0.13	0.53±0.10	0.65±0.09	0.57±0.15
PD28	0.44±0.11	0.46±0.24	0.58±0.24	0.46±0.10	0.47±0.14	0.5±0.13	0.49±0.19
Non-PD21	0.25±0.06	0.25±0.02	0.24±0.07	0.22±0.09	0.23±0.10	0.22±0.07	0.25±0.06
Non-PD28	0.25±0.03	0.26±0.05	0.26±0.02	0.28±0.17	0.27±0.05	0.27±0.05	0.25±0.09

MV – Mésio-Vestibular; V – Vestibular; DV – Disto-Vestibular; ML – Mésio-Lingual; L – Lingual; DL – Disto-Lingual.

3.2. Análise Histológica

Os órgãos reprodutores femininos e os fragmentos de maxila analisados foram pontuados para as condições de inflamação e necrose.

No que se refere aos órgãos reprodutores femininos, os ovários e as trompas de Falópio são as estruturas que apresentaram um menor *score* inflamatório (1), observando-se menos de 10 células inflamatórias por campo de visão. Por outro lado, o útero é o órgão em que se verificou um maior número de células inflamatórias por campo de visão e consequentemente uma maior componente inflamatória. No protocolo de indução de periodontite de 21 dias verificou-se um número aumentado de células inflamatórias comparativamente ao grupo controlo (61.20 ± 26.13 vs 45.5 ± 14.85). Já no protocolo de 28 dias também se observou uma maior contagem de células inflamatórias comparativamente ao grupo controlo (57.80 ± 26.05 vs 47.5 ± 14.85 vs 47.50 ± 45.97). Comparando os dois protocolos é possível confirmar que o protocolo de menor duração (21 dias) apresentou resultados superiores para a inflamação (61.20 ± 26.13 vs 57.80 ± 26.05), sendo o tipo celular predominante em ambos os eosinófilos. Comparando os dois protocolos de indução de periodontite em termos estatísticos, através do teste ANOVA, foi possível determinar uma variância de 0.07, não sendo, portanto, significativa.

No que diz respeito ao periodonto, a inflamação subsequente da periodontite ativa é notória, estando neste caso os neutrófilos em destaque. Quando comparados os dois protocolos de indução de periodontite verifica-se que no protocolo de 21 dias o *score* inflamatório é mais alto comparativamente ao de 28 dias. Exemplo disto é que dos 5 animais utilizados neste protocolo 4 destes apresentam um *score* de 4, indicando a presença de mais de 100 células inflamatórias por campo de visão. No que toca ao protocolo de 28 dias existe inflamação inerente, no entanto, com um *score* mais baixo. Este facto comprova a inflamação aguda presente numa fase inicial da doença que tende a estabilizar, daí a cronicidade ser uma das características da periodontite.

Em relação à condição necrótica das amostras estudadas verificou-se que tanto no grupo controlo como no grupo experimental o score foi de 1, indicando a presença de uma extensão de tecido necrosado entre 0 e 25%, sendo, portanto, irrisória.

3.3. Análise Sanguínea

Relativamente ao protocolo de indução de periodontite de 21 dias podemos verificar que existem componentes sanguíneos que apresentam uma maior expressividade sérica em condições de periodontite ativa comparativamente com o grupo controlo tais como os neutrófilos (15.76 ± 4.68 vs 8.05 ± 0.49), basófilos (0.14 ± 0.31 vs 0.00 ± 0.00), fosfatase alcalina (108.20 ± 25.33 vs 68.50 ± 13.44), antiestreptolisina (TASO) (2.63 ± 3.36 vs 1.20 ± 1.41), IgA (1.46 ± 0.30 vs 0.90 ± 0.00). Por outro lado, existem parâmetros sanguíneos em que se verificou uma diminuição comparativamente ao grupo controlo tais como os linfócitos (82.62 ± 4.39 vs 90.1 ± 0.42), o estradiol (14.58 ± 13.29 vs 24.4 ± 24.89), progesterona (9.84 ± 3.01 vs 14.15 ± 9.69), ferro (419.00 ± 45.74 vs 478.50 ± 54.45) e ureia (42.34 ± 2.38 vs 46.00 ± 1.41). Em termos estatísticos, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas (Tabela 3 e Figura 10).

No que toca ao protocolo de 28 dias também existem parâmetros sanguíneos que se encontram aumentados como os neutrófilos (13.10 ± 8.62 vs 6.95 ± 2.19), PCR (0.005 ± 0.01 vs 0.000 ± 0.00), TASO (5.78 ± 9.32 vs 2.55 ± 0.64) e IgG (73.38 ± 8.45 vs 59.5 ± 0.71). Em oposição, os linfócitos (84.94 ± 9.88 vs 91.5 ± 2.55), o estradiol (14.94 ± 12.71 vs 25.30 ± 22.34) e a ureia (42.60 ± 4.34 vs 45.5 ± 0.71) encontram-se diminuídos em comparação com o grupo controlo. Em termos estatísticos, e tal como no

protocolo de menor duração, não se verificam diferenças estatísticas relevantes (Tabela 3).

Quando comparados os dois protocolos verifica-se que no protocolo de 21 dias existem alguns parâmetros aumentados relativamente ao protocolo de 28 dias: contagem de plaquetas (627.60 ± 131.19 vs 542.40 ± 216.61), neutrófilos (15.76 ± 4.68 vs 13.10 ± 8.62), fosfatase alcalina (108.20 ± 25.33 vs 60.60 ± 11.55), creatinina quinase (CK) (1336.60 ± 576.06 vs 1147.75 ± 392.69) e IgG (93.32 ± 20.70 vs 73.38 ± 8.45). Por outro lado, no protocolo de 28 dias também se verificam alguns parâmetros aumentados, tais como: linfócitos (28 dias 84.94 ± 9.85 vs 21 dias 82.62 ± 4.39), T3 (131.60 ± 12.83 vs 123.30 ± 15.35) e alanina aminotransferase (ALT) (49.60 ± 21.62 vs 35.80 ± 6.26) (Tabela 3).

Em termos estatísticos, e recorrendo aos testes comparadores, verificaram-se algumas diferenças estatisticamente significativas quando comparados os dois protocolos de 21 e 28 dias. Assim, PCR (aos 21 dias 0.0034 ± 0.00 vs aos 28 dias 0.005 ± 0.01), com $p=0.046$; fosfatase alcalina (aos 21 dias 108.2 ± 25.33 vs aos 28 dias 60.6 ± 11.55), com $p=0.0142$; IgG (aos 21 dias 93.32 ± 20.70 vs aos 28 dias 73.38 ± 8.45), com $p=0.043$. Relativamente aos outros parâmetros analisados e utilizando os testes comparadores não se verificaram resultados estatisticamente significativos (Tabela 3).

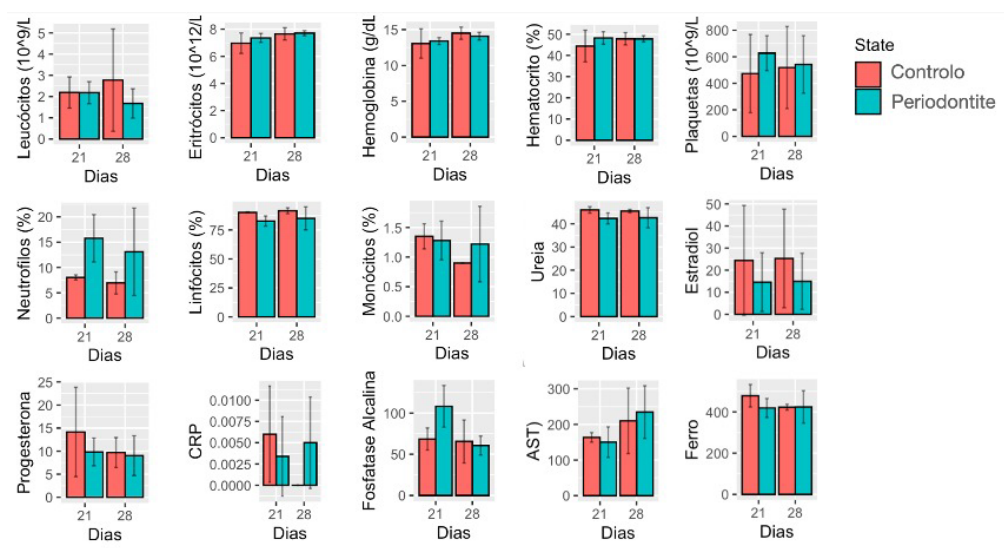


Figura 10 | Gráficos representativos dos níveis de vários componentes sanguíneos nos grupos experimentais e nos grupos controlos.

Tabela 3 | Resultados e análise estatística das análises sanguíneas efetuadas: média, desvio padrão, diferença de médias, *p-value* e intervalo de confiança

Análise	Média e Desvio Padrão				Diferença de Médias			<i>p-value</i>			95% IC		
	PD21	C21	PD28	C28	PD21 vs C21	PD28 vs C28	PD21 vs PD28	PD21 vs C21	PD28 vs C28	PD21 vs PD28	PD21 vs C21	PD28 vs C28	PD21 vs PD28
Contagem Leucocitária (10⁹/L)	2.18±0.52	2.19±0.74	1.67±0.69	2.78±2.41	- 0.01	- 1.10	0.51	0.95	0.48	0.27	0.95	0.48	0.27
Contagem de Eritrócitos (10¹²/L)	7.36±0.33	6.98±0.76	7.71±0.19	7.66±0.45	0.39	0.05	- 0.35	0.48	0.85	0.09	0.48	0.85	0.09
Hemoglobina (g/dL)	13.40±0.48	13.05±2.05	14.08±0.54	14.50±0.85	0.35	- 0.42	- 0.68	0.66	0.57	0.09	0.66	0.57	0.09
Hematócrito (%)	48.24±2.96	44.40±7.50	47.84±1.45	47.85±2.90	3.84	- 0.01	0.4	0.48	0.57	0.007	0.48	0.57	0.57
Contagem de Plaquetas (10⁹/L)	627.60±131.19	473.50±294.86	542.40±216.61	519.00±309.71	154.1	23.4	85.2	0.38	1.00	0.52	0.38	1.01	0.52
Neutrófilos (%)	15.76±4.68	8.05±0.49	13.10±8.62	6.95±2.19	7.71	6.15	2.66	0.10	0.29	0.59	0.10	0.29	0.59
Linfócitos (%)	82.62±4.39	90.10±0.42	84.94±9.88	91.50±2.55	- 7.48	- 6.56	- 2.32	0.10	0.29	0.67	0.10	0.29	0.67
Monócitos (%)	1.28±0.33	1.35±0.21	1.22±0.64	0.90±0.00	- 0.07	0.32	0.06	0.85	0.66	0.95	0.85	0.66	0.96
Eosinófilos (%)	0.20±0.31	0.50±0.14	0.64±0.91	0.65±0.35	- 0.30	- 0.01	- 0.44	0.39	0.85	0.47	0.39	0.85	0.47

Basófilos (%)	0.14±0.31	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00									
Estradiol	14.58±13.29	24.4±24.89	14.94±12.71	25.3±22.34	- 9.82	- 10.36	- 0.36	0.38	0.49	0.10	0.38	0.49	0.99
FSH	<0.30±0.00	<0.30±0.00	<0.30±0.00	<0.30±0.00									
Progesterona	9.84±3.01	14.15±9.69	9.02±4.32	9.7±3.25	- 4.31	- 0.68	0.82	0.49	0.95	0.71	0.49	0.95	0.71
TSH	0.005±0.00	0.005±0.00	0.005±0.00	Sem amostra									
T4	4.31±0.44	4.30±0.57	4.16±0.69	Sem amostra	- 0.20	- 0.68	- 0.06	0.67	0.95	0.91	0.67	0.95	0.90
Cortisol	2.30±0.70	2.20±0.28	2.26±0.55	2.90±0.99	0.10	- 0.64	0.04	0.86	0.48	0.95	0.86	0.48	0.95
LH	<0.30±0.00	<0.30±0.00	<0.30±0.00	<0.30±0.00									
T3	123.30±15.35	124.00±7.07	131.60±12.83	Sem amostra	- 0.80	- 0.64	- 11.8	1.00	0.48	0.24	1.01	0.48	0.24
PCR	0.0034±0.00	0.006±0.01	0.005±0.01	0.00±0.00	0.001	0.004	- 0.005	0.99	0.48	0.046	0.97	0.48	0.05
Albumina	4.05±0.56	4.45±0.07	4.33±0.29	4.55±0.35	- 0.13	- 0.23	- 0.01	0.67	0.53	1.00	0.67	0.53	1.02
Fosfatase Alcalina	108.20±25.33	68.50±13.44	60.60±11.55	65.50±26.16	39.70	- 4.90	47.60	0.20	0.85	0.0142	0.20	0.85	0.01
ALT	35.80±6.26	38.50±2.12	49.60±21.62	54.00±16.97	- 2.70	- 4.40	- 13.8	0.77	0.85	0.13	0.77	0.85	0.13
Amilase	1696.60±258.01	1587.00±144.25	1762.80±238.92	1534.50±103.94	109.60	219.30	- 66.20	0.67	0.29	0.71	0.67	0.29	0.71

Amilase P	1440.60±211.90	1244.40±111.02	1534.25±167.69	1359.00±1350.00	96.10	184.25	- 102.65	0.58	0.41	0.47	0.58	0.41	0.47
AST	150.20±42.70	163.50±13.44	234.60±73.91	210.00±91.92	- 13.30	24.6	- 84.4	0.75	0.87	0.08	0.75	0.87	0.08
Cálcio	2.85±0.21	2.80±0.01	2.72±0.15	Sem amostra	0.05	184.25	0.13	0.96	0.41	0.42	0.96	0.41	0.42
CK	1336.60±576.06	1111.50±181.73	1147.75±392.69	1329.50±1112.43	225.10	- 181.75	188.85	0.76	0.81	0.70	0.76	0.81	0.70
Creatinina	0.47±0.05	0.46±0.01	0.48±0.02	0.50±0.02	0.01	- 0.03	- 0.01	0.96	0.38	0.88	0.96	0.38	0.88
Ferritina	<0.05±0.00	<0.05±0.00	<0.05±0.00	<0.05±0.00									
GGT	<0.10±0.00	<0.10±0.00	<0.10±0.00	<0.10±0.00									
Ferro	419.00±45.74	478.50±54.45	424.25±78.39	423.00±14.14	- 59.50	1.25	- 5.25	0.29	1.00	0.91	0.29	1.03	0.91
LDH	964.80±293.20	1073.00±74.95	987.00±82.25	860.50±218.50	- 108.20	126.50	- 22.20	0.57	0.41	0.87	0.57	0.41	0.87
Lipase	6.32±0.15	5.85±0.07	5.97±0.38	5.60±5.60	0.35	- 0.43	0.93	0.29	0.99	0.10	0.29	0.99	0.10
Proteínas Totais	5.90±0.55	6.15±0.07	6.06±0.29	6.20±0.28	- 0.25	- 0.14	- 0.16	0.66	0.87	0.68	0.66	0.87	0.68
Ureia	42.34±2.38	46.00±1.41	42.60±4.34	45.50±0.71	- 3.66	- 2.9	- 0.26	0.20	0.38	0.95	0.20	0.38	0.95
TASO	2.63±3.36	1.20±1.41	5.78±9.32	2.55±0.64	0.35	- 0.43	0.93	0.29	0.99	0.10	0.29	0.99	0.10
IgA	1.46±0.30	0.90±0.00	1.14±0.26	1.80±0.42	0.56	- 0.66	0.32	0.10	0.20	0.15	0.10	0.20	0.15

IgM	6.70±3.29	5.00±1.13	6.44±2.11	5.85±0.35	1.70	0.59	0.26	0.77	0.95	0.91	0.77	0.95	0.91
IgG	93.32±20.70	98.50±13.44	73.38±8.45	59.50±0.71	- 5.18	13.88	19.94	0.76	0.10	0.043	0.76	0.10	0.04

PD21 – Grupo de indução de periodontite de 21 dias; C21 – Grupo controlo aos 21 dias; PD28 – Grupo de indução de periodontite de 28 dias; C28 – Grupo controlo aos 28 dias; FSH – Hormona foliculo-estimulante; TSH – Hormona estimulante da tiróide; LH – Hormona luteínica; T3 – Triiodotironina; PCR – Proteína C Reativa; ALT – Alanina aminotransferase; AST - Aspartato Aminotransferase; CK – Creatinina Quinase; GGT – Gamaglutamiltransferase; LDH - Lactato Desidrogenase; TASO – Antiestreptolisina; IgA – Imunoglobulina A; IgM – Imunoglobulina M; IgG – Imunoglobulina G.

IV. DISCUSSÃO

4.1. Principais Resultados

O presente estudo demonstrou que a periodontite se encontra associada a reabsorção óssea alveolar bem como alterações dos parâmetros inflamatórios. Assim, verificou-se um aumento dos parâmetros inflamatórios, tanto a nível histológico como sanguíneo, ao nível do periodonto e dos órgãos reprodutores femininos.

Através da análise macroscópica da reabsorção óssea alveolar foi possível verificar que a periodontite tem consequências ao nível dos tecidos moles e duros do periodonto, lesando-os. Tal como se verificou em estudos anteriores comprovou-se que os ratos são um modelo animal viável no que toca à dinâmica remodelação óssea aquando da presença de periodontite ativa, sendo esta regulada pela osteoclastogénese (Wu et al., 2020). De Molon e colaboradores (2018) verificaram, através do mesmo método de indução de periodontite, uma perda óssea alveolar generalizada, com especial destaque para as localizações distais, tal como o presente estudo corrobora (em disto-vestibular, aos 21 dias 0.67 ± 0.17 vs 0.24 ± 0.07 ; em disto-palatino, aos 21 dias 0.65 ± 0.09 vs 0.22 ± 0.07 ; em disto-vestibular, aos 28 dias 0.58 ± 0.34 vs 0.26 ± 0.02 ; em disto-palatino, aos 28 dias 0.50 ± 0.13 vs 0.27 ± 0.05). Além disso, tal como em investigações anteriores, observou-se que a perda óssea foi mais evidente no protocolo de duração inferior comparativamente ao de maior duração, facto que atesta uma das principais características da periodontite, a sua cronicidade. Ao comparar estes resultados com estudos realizados anteriormente, verifica-se a existência de duas fases distintas no decorrer da doença: uma fase aguda, com uma crescente ativação dos osteoclastos e consequente destruição dos tecidos periodontais (que ocorre numa primeira instância) e uma fase crónica/de estabilização em que se verifica um decréscimo dos níveis de osteoclastos e um cessar da inflamação inerente à doença enquanto os tecidos tendem reposicionar-se numa posição mais apical (de Molon et al., 2018; Marchesan et al., 2018; O'Boyle et al., 2020; Wu et al., 2020).

No que toca à análise histológica, verificou-se uma inflamação inerente à existência de periodontite ativa, sendo esta bastante evidente no periodonto e no útero. Relativamente ao periodonto é possível verificar que o *score* inflamatório é maior no protocolo de 21 dias comparativamente ao de 28 dias, sendo os neutrófilos as células inflamatórias em destaque. O infiltrado de neutrófilos observado no periodonto relaciona-

se com a inflamação aguda inerente à instalação da doença, sendo que estas células apresentam, para além de função antimicrobiana, um papel fundamental no início da modulação da resposta inflamatória e imunidade inata (Hajishengallis, 2020; McGlade et al., 2022; Wang et al., 2021). A plausibilidade do protocolo de 21 dias apresentar um *score* inflamatório maior do que o de 28 dias deve-se mais uma vez a uma possível estabilização da doença, com um cessar/diminuição da inflamação inerente (de Molon et al., 2018). No que concerne aos órgãos reprodutores femininos, comprova-se que a periodontite pode levar a uma inflamação dos mesmos. Dos órgãos em análise, as trompas de Falópio e os ovários apresentaram um *score* inflamatório baixo, com a presença de menos de dez células inflamatórias por campo de visão. Por outro lado, o útero foi o órgão mais afetado com a predominância eosinófilos, células especializadas que estão envolvidas no combate a vários tipos de infeções, inclusive infeções bacterianas, como é o caso da periodontite. No entanto, a presença de eosinófilos também pode ser associada a funções de homeostasia, nomeadamente na regulação do desenvolvimento das glândulas mamárias e preparação do útero para a gravidez (Marichal et al., 2017; Wechsler et al., 2021).

Também a nível sanguíneo se verificou um aumento da componente inflamatória, tanto a nível sistémico como dos órgãos reprodutores femininos. Tal como previsto verificou-se, em ambos os protocolos, um aumento da percentagem de neutrófilos, sendo que estes apresentam um papel fundamental na imunidade inata, e também em casos de inflamação crónica dado que contribuem para a resolução da condição infecciosa através da libertação de serina protease e ativação de células imunitárias (Cecoro et al., 2020; Herrero-Cervera et al., 2022; McGlade et al., 2022), estando portanto presentes nas várias fases inflamatórias, tanto aos 21 dias como aos 28 dias. Também a TASO, que é um exame indicador de infeção recente por *streptococcus*, se encontrava aumentada, algo expectável dada a etiologia da periodontite. Por outro lado, verificou-se uma diminuição de ureia, um biomarcador da função renal, em ambos os protocolos o que pode indicar uma possível disfunção renal associada à inflamação sistémica inerente à periodontite (Dörfer et al., 2017).

No protocolo de indução de periodontite de 21 dias, verificou-se um aumento dos níveis de fosfatase alcalina, um biomarcador de *turn-over* ósseo, comparativamente ao protocolo de maior duração (aos 21 dias 108.20 ± 25.33 vs aos 28 dias 60.60 ± 11.5), facto que podemos relacionar com a maior perda óssea alveolar observada no protocolo de menor duração aquando da análise macroscópica (Wu et al., 2020). Também neste

protocolo se observou um aumento dos níveis de IgA (21 dias 1.46 ± 0.30 vs controlo 0.90 ± 0.00), algo expectável uma vez que esta é a principal imunoglobulina secretada pela mucosa oral, estando demonstrado que apresenta um papel ativo na proteção contra os patógenos da periodontite (Napimoga et al., 2011). Por outro lado, verificou-se uma diminuição dos níveis de ferro (21 dias 419.00 ± 45.74 vs controlo 465.50 ± 54.45), condição que acontece frequentemente em doentes periodontais devido a uma maior produção de células leucocitárias, levando a uma diminuição da contagem de eritrócitos e consequentemente a anemia ferropénica por défice de ferro (Nibali et al., 2019).

No que concerne ao protocolo de indução de periodontite de 28 dias, verificou-se um aumento dos níveis séricos de PCR (28 dias 0.005 ± 0.01 vs controlo 0.00 ± 0.00), uma proteína de fase aguda produzida pelo fígado que é secretada como resposta a situações de infeção ou dano tecidual (Machado et al., 2021). Ao compararmos a contagem de linfócitos do protocolo de 21 dias com a dos 28 dias verificamos que é ligeiramente superior no último (21 dias 82.62 ± 4.39 vs 28 dias 84.94 ± 9.88), facto que é plausível uma vez que os linfócitos estão associados a fases inflamatórias mais tardias e à imunidade adaptativa, em que existe a criação de anticorpos contra um determinado patógeno (McGlade et al., 2022); dado o aumento de linfócitos no protocolo de 28 dias era previsível um aumento de IgG dado que esta é produzida pelos linfócitos B.

Relativamente aos órgãos reprodutores femininos, é possível observar um aumento dos parâmetros inflamatórios com consequente diminuição dos níveis hormonais femininos. Assim, em ambos os protocolos, verificou-se uma diminuição tanto dos níveis de estradiol (aos 21 dias 14.58 ± 13.29 vs controlo 24.40 ± 24.89 ; aos 28 dias 14.94 ± 12.71 vs controlo 25.30 ± 22.34) como de progesterona (aos 21 dias 9.84 ± 3.01 vs controlo 14.15 ± 9.69 ; aos 28 dias 9.02 ± 4.32 vs 9.70 ± 3.25).

Devido à escassez de literatura relativamente aos efeitos da periodontite nos órgãos reprodutores femininos é fundamental perceber qual o possível mecanismo biológico inerente a possível associação. Desta forma, esta inflamação pode estar relacionada com o aumento das citocinas pró-inflamatórias e a diminuição das citocinas anti-inflamatórias, que ao entrarem na circulação sistémica, afetam tecidos e órgãos que se encontram à distância, inclusive órgãos do sistema reprodutor feminino, levando a alterações do ciclo de ovulações e da produção de hormonas esteróides (Hajishengallis & Chavakis, 2021; Shi et al., 2019; Snider & Wood, 2019). O aumento destas citocinas pró-inflamatórias, onde se incluem a TNF- α , IL-1 β e IL-6, amplamente associadas à periodontite, também estão relacionadas com uma disrupção do normal metabolismo

lipídico e da glucose, induzindo assim uma disfunção metabólica (Shi et al., 2019). Como resultado desta disfunção dá-se um aumento dos níveis de triglicéridos circulantes, que são armazenados nos adipócitos, provocando uma hipertrofia dos mesmos e consequentemente uma necrose induzida por hipóxia com infiltração de macrófagos circulantes nos adipócitos. Estes macrófagos promovem a secreção adicional de citocinas pró-inflamatórias levando a um consecutivo aumento da condição inflamatória (Snider & Wood, 2019). Por outro lado, as hormonas esteróides como a progesterona e o estradiol, são derivadas do colesterol e responsáveis por um conjunto de alterações estruturais, funcionais e de homeostasia que ocorrem no aparelho reprodutor feminino, incluindo no útero. Desta forma, variações nos níveis de colesterol, associadas à disfunção metabólica lipídica, levam a alterações no processo de esteroidogénese, e consequentemente, a alterações nos níveis das mesmas (Yang et al., 2022), com implicações a nível uterino (Maliqueo et al., 2016).

É de ter em consideração que os níveis hormonais medidos diferem consoante a fase do ciclo menstrual em que cada fêmea se encontrava, sendo que nos roedores o ciclo é bastante curto (cerca de quatro ou cinco dias), existindo portanto oscilações constantemente das concentrações hormonais (Marcondes et al., 2002).

4.2. Forças e Limitações

Ao longo da presente investigação verificaram-se algumas limitações, estando estas associadas, principalmente, ao modelo de estudo – modelos animais. Primeiramente é de referir que este tipo de modelo não nos permite mimetizar na sua totalidade a cronicidade da doença uma vez que os protocolos utilizados foram de duração média, ao contrário das patologias crónicas que apresentam uma progressão lenta e de longa duração. A utilização da técnica anestésica por injeção intraperitoneal pode ser fator confundente no que toca à inflamação uterina devido à proximidade com o órgão reprodutor. Por outro lado, os roedores apresentam um ciclo menstrual bastante curto com várias alterações ao nível hormonal, sendo, portanto, difícil determinar em que fase do mesmo se encontravam. Por último, é de destacar a complexidade da colocação das ligaduras uma vez que a cavidade oral dos animais é bastante pequena. É possível verificar este facto através da observação dos resultados da avaliação da perda óssea, que nos mostra que existe uma variação dentro da própria amostra, isto é, a reabsorção óssea

tende a revelar-se aumentada à medida que a experiência do operador foi aumentando com a colocação das ligaduras.

No entanto, é de sublinhar a fiabilidade deste modelo animal dado que apresenta bastantes semelhanças com o Ser Humano ao nível do início e progressão da doença, simulando os processos que ocorrem *in vivo*, sem o comprometimento ético associado aos estudos em humanos. Relativamente ao método escolhido para indução da doença – colocação de ligaduras – este foi amplamente descrito como aquele que melhor mimetiza a periodontite bem como os mecanismos moleculares inerentes ao desenvolvimento da mesma no Ser Humano. É ainda de destacar a perda óssea previsível e localizada, característica da periodontite.

4.3. Perspetivas Futuras

Dada a escassez de evidência científica no que concerne ao impacto da periodontite no aparelho reprodutor feminino existe a necessidade crescente de mais estudos, utilizando amostras animais mais amplas e de diferentes durações ao nível do protocolo de indução de periodontite. Através da utilização de um protocolo de maior duração seria possível reproduzir a cronicidade da periodontite. Também seria de relevância clínica a utilização de animais com outras comorbilidades uma vez que a periodontite apresenta fatores de risco, nomeadamente a idade, estando esta associada obviamente a uma menor eficácia do sistema imunitário. É ainda importante perceber e comprovar se estas alterações nos órgãos reprodutores femininos terão consequências ao nível da fertilidade e se estarão relacionadas com *outcomes* negativos da gravidez. De modo a evitar a inflamação subsequente da injeção intraperitoneal, seria interessante a utilização de outro tipo de anestesia, como por exemplo, através da técnica anestésica inalatória.

V. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram um aumento dos parâmetros inflamatórios tanto ao nível do periodonto como do útero, corroborando a relação entre a periodontite e a inflamação sanguínea e dos órgãos reprodutores femininos. Ainda que a nível estatístico não se verifiquem variações sanguíneas significativas, os presentes resultados parecem demonstrar uma consequência da periodontite no endométrio, podendo abrir novas linhas de investigação relativas à importância dos cuidados de saúde periodontal na saúde sistémica e na saúde do aparelho reprodutor feminino.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe, T., & Hajishengallis, G. (2013). Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *Journal of Immunological Methods*, 394(1–2), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.05.002>

Albandar, J. M., Susin, C., & Hughes, F. J. (2018). Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S171–S189. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12947>

Arweiler, N. B., & Netuschil, L. (2016). The Oral Microbiota. Em A. Schwartz (Ed.), *Microbiota of the Human Body* (Vol. 902, pp. 45–60). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31248-4_4

Bartold, P. M. (2018). Lifestyle and periodontitis: The emergence of personalized periodontics. *Periodontology 2000*, 78(1), 7–11. <https://doi.org/10.1111/prd.12237>

Botelho, J., Machado, V., Leira, Y., Proença, L., Chambrone, L., & Mendes, J. J. (2022). Economic burden of periodontitis in the United States and Europe: An updated estimation. *Journal of Periodontology*, 93(3), 373–379. <https://doi.org/10.1002/JPER.21-0111>

Botelho, J., Machado, V., Mascarenhas, P., Rua, J., Alves, R., Cavacas, M. A., Delgado, A., & João Mendes, J. (2018). Stress, salivary cortisol and periodontitis: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Archives of Oral Biology*, 96, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.08.016>

Botelho, J., Machado, V., & Mendes, J. J. (2021). Periodontal Health and Blood Disorders. *Current Oral Health Reports*, 8(4), 107–116. <https://doi.org/10.1007/s40496-021-00301-w>

Botelho, J., Machado, V., Proença, L., Alves, R., Cavacas, M. A., Amaro, L., & Mendes, J. J. (2019). Study of Periodontal Health in Almada-Seixal (SoPHiAS): A cross-sectional study in the Lisbon Metropolitan Area. *Scientific Reports*, 9(1), 15538. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52116-6>

Cecoro, G., Annunziata, M., Iuorio, M. T., Nastri, L., & Guida, L. (2020). Periodontitis, Low-Grade Inflammation and Systemic Health: A Scoping Review. *Medicina*, 56(6), 272. <https://doi.org/10.3390/medicina56060272>

Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., & Van Dyke, T. E. (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease: Inflammatory and immune pathways in periodontal disease. *Periodontology 2000*, 64(1), 57–80. <https://doi.org/10.1111/prd.12002>

Chapple, I. L. C., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., Geisinger, M. L., Genco, R. J., Glogauer, M., Goldstein, M., Griffin, T. J., Holmstrup, P., Johnson, G. K., Kapila, Y., Lang, N. P., Meyle, J., Murakami, S., Plemons, J., Romito, G. A., ... Yoshie, H. (2018). Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89, S74–S84. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0719>

Chen, M. X., Zhong, Y. J., Dong, Q. Q., Wong, H. M., & Wen, Y. F. (2021). Global, regional, and national burden of severe periodontitis, 1990–2019: An analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *Journal of Clinical Periodontology*, 48(9), 1165–1188. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13506>

Curtis, M. A., Zenobia, C., & Darveau, R. P. (2011). The Relationship of the Oral Microbiota to Periodontal Health and Disease. *Cell Host & Microbe*, 10(4), 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.008>

Darveau, R. P. (2010). Periodontitis: A polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 481–490. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2337>

de Molon, R. S., Mascarenhas, V. I., de Avila, E. D., Finoti, L. S., Toffoli, G. B., Spolidorio, D. M. P., Scarel-Caminaga, R. M., Tetradis, S., & Cirelli, J. A. (2016). Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of

experimental periodontal disease in mice. *Clinical Oral Investigations*, 20(6), 1203–1216. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1607-0>

de Molon, R. S., Park, C. H., Jin, Q., Sugai, J., & Cirelli, J. A. (2018). Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microscopy Research and Technique*, 81(12), 1412–1421. <https://doi.org/10.1002/jemt.23101>

de Souza, J. A. C., Nogueira, A. V. B., de Souza, P. P. C., Cirelli, J. A., Garlet, G. P., & Rossa, C. (2011). Expression of suppressor of cytokine signaling 1 and 3 in ligature-induced periodontitis in rats. *Archives of Oral Biology*, 56(10), 1120–1128. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.03.022>

Despacho normativo do Ministério Público: Declaração Universal dos Direitos Humanos. (1978). Diário da República, nº57/58, Série I de 09-03-1978. https://gddc.ministeriopublico.pt/sites/default/files/documentos/pdf/declaracao_universal_dos_direitos_do_homem.pdf

Dörfer, C., Benz, C., Aida, J., & Campard, G. (2017). The relationship of oral health with general health and NCDs: A brief review. *International Dental Journal*, 67, 14–18. <https://doi.org/10.1111/idj.12360>

Dumitrescu, A. L. (2016). Editorial: Periodontal Disease – A Public Health Problem. *Frontiers in Public Health*, 3. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2015.00278>

Ebersole, J. L., Graves, C. L., Gonzalez, O. A., Dawson, D., Morford, L. A., Huja, P. E., Hartsfield, J. K., Huja, S. S., Pandruvada, S., & Wallet, S. M. (2016). Aging, inflammation, immunity and periodontal disease. *Periodontology 2000*, 72(1), 54–75. <https://doi.org/10.1111/prd.12135>

Eke, P. I., Dye, B. A., Wei, L., Slade, G. D., Thornton-Evans, G. O., Borgnakke, W. S., Taylor, G. W., Page, R. C., Beck, J. D., & Genco, R. J. (2015). Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *Journal of Periodontology*, 86(5), 611–622. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.140520>

Eke, P. I., Wei, L., Borgnakke, W. S., Thornton-Evans, G., Zhang, X., Lu, H., McGuire, L. C., & Genco, R. J. (2016). Periodontitis prevalence in adults ≥ 65 years of age, in the USA. *Periodontology 2000*, 72(1), 76–95. <https://doi.org/10.1111/prd.12145>

Escalda, C., Botelho, J., Mendes, J. J., & Machado, V. (2021). Association of bacterial vaginosis with periodontitis in a cross-sectional American nationwide survey. *Scientific Reports*, 11(1), 630. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79496-4>

Fact Sheet WHO/318, de fevereiro de 2007, Genebra, World Health Organization

Fogacci, M. F., Barbirato, D. da S., Amaral, C. da S. F., da Silva, P. G., Coelho, M. de O., Bertozi, G., de Carvalho, D. P., & Leão, A. T. T. (2016). No association between periodontitis, preterm birth, or intrauterine growth restriction: Experimental study in Wistar rats. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 214(6), 749.e1-749.e11. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.12.008>

Gao, J., Cai, S., Wang, Z., Li, D., Ou, M., Zhang, X., & Tian, Z. (2022). The optimization of ligature/bone defect-induced periodontitis model in rats. *Odontology*, 110(4), 697–709. <https://doi.org/10.1007/s10266-022-00715-7>

Garcia de Aquino, S., Manzolli Leite, F. R., Stach-Machado, D. R., Francisco da Silva, J. A., Spolidorio, L. C., & Rossa, C. (2009). Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. *Life Sciences*, 84(21–22), 745–754. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.03.001>

Gasner, N. S., & Schure, R. S. (2022). Periodontal Disease. Em *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554590/>

Genco, R. J., & Borgnakke, W. S. (2013). Risk factors for periodontal disease: *Risk factors for periodontal diseases*. *Periodontology 2000*, 62(1), 59–94. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x>

Glick, M., Williams, D. M., Kleinman, D. V., Vujicic, M., Watt, R. G., & Weyant, R. J. (2016). A new definition for oral health developed by the FDI World Dental Federation opens the door to a universal definition of oral health. *The Journal of the American Dental Association*, 147(12), 915–917. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2016.10.001>

Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030. Geneva: *World Health Organization*; 2022

Graves, D. T., Kang, J., Andriankaja, O., Wada, K., & Rossa, Jr., C. (2012). Animal Models to Study Host-Bacteria Interactions Involved in Periodontitis. Em D. F. Kinane & A. Mombelli (Eds.), *Frontiers of Oral Biology* (Vol. 15, pp. 117–132). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000329675>

Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15(1), 30–44. <https://doi.org/10.1038/nri3785>

Hajishengallis, G. (2020). New developments in neutrophil biology and periodontitis. *Periodontology 2000*, 82(1), 78–92. <https://doi.org/10.1111/prd.12313>

Hajishengallis, G., & Chavakis, T. (2021). Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. *Nature Reviews Immunology*, 21(7), 426–440. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00488-6>

Harvey, J. D. (2017). Periodontal Microbiology. *Dental Clinics of North America*, 61(2), 253–269. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2016.11.005>

Herrero-Cervera, A., Soehnlein, O., & Kenne, E. (2022). Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cellular & Molecular Immunology*, 19(2), 177–191. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00832-3>

Hussain, S. B., Botelho, J., Machado, V., Zehra, S. A., Mendes, J. J., Ciurtin, C., Orlandi, M., & D’Aiuto, F. (2020). Is there a bidirectional association between

rheumatoid arthritis and periodontitis? A systematic review and meta-analysis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 50(3), 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2020.01.009>

Hussain, S. B., Leira, Y., Zehra, S. A., Botelho, J., Machado, V., Ciurtin, C., D'Aiuto, F., & Orlandi, M. (2022). Periodontitis and Systemic Lupus Erythematosus: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontal Research*, 57(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/jre.12936>

Johnson, N., van Voorst, S., Sowter, M. C., Strandell, A., & Mol, B. W. J. (2010). Surgical treatment for tubal disease in women due to undergo in vitro fertilisation. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002125.pub3>

Kassebaum, N. J., Bernabé, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C. J. L., & Marcenes, W. (2014). Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010: A Systematic Review and Meta-regression. *Journal of Dental Research*, 93(11), 1045–1053. <https://doi.org/10.1177/0022034514552491>

Kassebaum, N. J., Smith, A. G. C., Bernabé, E., Fleming, T. D., Reynolds, A. E., Vos, T., Murray, C. J. L., Marcenes, W., GBD 2015 Oral Health Collaborators, Abyu, G. Y., Alsharif, U., Asayesh, H., Benzian, H., Dandona, L., Dandona, R., Kasaeian, A., Khader, Y. S., Khang, Y. H., Kokubo, Y., ... Yonemoto, N. (2017). Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *Journal of Dental Research*, 96(4), 380–387. <https://doi.org/10.1177/0022034517693566>

Kim, Y. G., Lee, S. M., Bae, S., Park, T., Kim, H., Jang, Y., Moon, K., Kim, H., Lee, K., Park, J., Byun, J.-S., & Kim, D.-Y. (2021). Effect of Aging on Homeostasis in the Soft Tissue of the Periodontium: A Narrative Review. *Journal of Personalized Medicine*, 11(1), 58. <https://doi.org/10.3390/jpm11010058>

Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17038. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.38>

Knight, E. T., Liu, J., Seymour, G. J., Faggion, C. M., & Cullinan, M. P. (2016). Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 71(1), 22–51. <https://doi.org/10.1111/prd.12110>

Kwon, T., Lamster, I. B., & Levin, L. (2021). Current Concepts in the Management of Periodontitis. *International Dental Journal*, 71(6), 462–476. <https://doi.org/10.1111/idj.12630>

Lalla, E., & Papapanou, P. N. (2011). Diabetes mellitus and periodontitis: A tale of two common interrelated diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(12), 738–748. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.106>

Lang, N. P., & Bartold, P. M. (2018). Periodontal health. *Journal of Periodontology*, 89, S9–S16. <https://doi.org/10.1002/JPER.16-0517>

Leira, Y., Iglesias-Rey, R., Gómez-Lado, N., Aguiar, P., Sobrino, T., D’Aiuto, F., Castillo, J., Blanco, J., & Campos, F. (2020). Periodontitis and vascular inflammatory biomarkers: An experimental in vivo study in rats. *Odontology*, 108(2), 202–212. <https://doi.org/10.1007/s10266-019-00461-3>

Li, Y., Jiao, J., Qi, Y., Yu, W., Yang, S., Zhang, J., & Zhao, J. (2021). Curcumin: A review of experimental studies and mechanisms related to periodontitis treatment. *Journal of Periodontal Research*, 56(5), 837–847. <https://doi.org/10.1111/jre.12914>

Lin, P., Niimi, H., Ohsugi, Y., Tsuchiya, Y., Shimohira, T., Komatsu, K., Liu, A., Shiba, T., Aoki, A., Iwata, T., & Katagiri, S. (2021). Application of Ligature-Induced Periodontitis in Mice to Explore the Molecular Mechanism of Periodontal Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8900. <https://doi.org/10.3390/ijms22168900>

Luis Muñoz-Carrillo, J., Elizabeth Hernández-Reyes, V., Eduardo García-Huerta, O., Chávez-Ruvalcaba, F., Isabel Chávez-Ruvalcaba, M., Mariana Chávez-Ruvalcaba, K., & Díaz-Alfaro, L. (2020). Pathogenesis of Periodontal Disease. Em N. Mohammed Ahmed Yussif (Ed.), *Periodontal Disease—Diagnostic and Adjunctive Non-surgical Considerations*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86548>

Machado, V., Botelho, J., Escalda, C., Hussain, S. B., Luthra, S., Mascarenhas, P., Orlandi, M., Mendes, J. J., & D'Aiuto, F. (2021). Serum C-Reactive Protein and Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Immunology*, 12, 706432. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.706432>

Machado, V., Botelho, J., Proença, L., & Mendes, J. J. (2020). Comparisons of Periodontal Status between Females Referenced for Fertility Treatment and Fertile Counterparts: A Pilot Case–Control Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(15), 5281. <https://doi.org/10.3390/ijerph17155281>

Machado, V., Escalda, C., Proença, L., Mendes, J. J., & Botelho, J. (2020). Is There a Bidirectional Association between Polycystic Ovarian Syndrome and Periodontitis? A Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Clinical Medicine*, 9(6), 1961. <https://doi.org/10.3390/jcm9061961>

Machado, V., Lopes, J., Patrão, M., Botelho, J., Proença, L., & Mendes, J. J. (2020). Validity of the association between periodontitis and female infertility conditions: A concise review. *Reproduction*, 160(3), R41–R54. <https://doi.org/10.1530/REP-20-0176>

Maliqueo, M., Echiburú, B., & Crisosto, N. (2016). Sex Steroids Modulate Uterine-Placental Vasculature: Implications for Obstetrics and Neonatal Outcomes. *Frontiers in Physiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00152>

Manrique-Corredor, E. J., Orozco-Beltran, D., Lopez-Pineda, A., Quesada, J. A., Gil-Guillen, V. F., & Carratala-Munuera, C. (2019). Maternal periodontitis and preterm birth: Systematic review and meta-analysis. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 47(3), 243–251. <https://doi.org/10.1111/cdoe.12450>

Marchesan, J., Girnary, M. S., Jing, L., Miao, M. Z., Zhang, S., Sun, L., Morelli, T., Schoenfisch, M. H., Inohara, N., Offenbacher, S., & Jiao, Y. (2018). An experimental murine model to study periodontitis. *Nature Protocols*, 13(10), 2247–2267. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0035-4>

Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., & Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4a), 609–614. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400008>

Marichal, T., Mesnil, C., & Bureau, F. (2017). Homeostatic Eosinophils: Characteristics and Functions. *Frontiers in Medicine*, 4, 101. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00101>

Mariotti, A., & Hefti, A. F. (2015). Defining periodontal health. *BMC Oral Health*, 15(S1), S6. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-15-S1-S6>

McGlade, E. A., Miyamoto, A., & Winuthayanon, W. (2022). Progesterone and Inflammatory Response in the Oviduct during Physiological and Pathological Conditions. *Cells*, 11(7), 1075. <https://doi.org/10.3390/cells11071075>

Michaud, D. S., Fu, Z., Shi, J., & Chung, M. (2017). Periodontal Disease, Tooth Loss, and Cancer Risk. *Epidemiologic Reviews*, 39(1), 49–58. <https://doi.org/10.1093/epirev/mxx006>

Muñoz Aguilera, E., Suvan, J., Buti, J., Czesnikiewicz-Guzik, M., Barbosa Ribeiro, A., Orlandi, M., Guzik, T. J., Hingorani, A. D., Nart, J., & D’Aiuto, F. (2020). Periodontitis is associated with hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Cardiovascular Research*, 116(1), 28–39. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz201>

Napimoga, M. H., Nunes, L. H. A. C., Maciel, A. A. B., Demasi, A. P. D., Benatti, B. B., Santos, V. R., Bastos, M. F., de Miranda, T. S., & Duarte, P. M. (2011). Possible Involvement of IL-21 and IL-10 on Salivary IgA Levels in Chronic Periodontitis

Subjects: Cytokines Role in IgA Production in Periodontitis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 74(6), 596–602. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2011.02605.x>

Nazir, M., Al-Ansari, A., Al-Khalifa, K., Alhareky, M., Gaffar, B., & Almas, K. (2020). Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *The Scientific World Journal*, 2020, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2020/2146160>

Nibali, L., Darbar, U., Rakmanee, T., & Donos, N. (2019). Anemia of inflammation associated with periodontitis: Analysis of two clinical studies. *Journal of Periodontology*, 90(11), 1252–1259. <https://doi.org/10.1002/JPER.19-0124>

Nutbeam, D., & Muscat, D. M. (2021). Health Promotion Glossary 2021. *Health Promotion International*, 36(6), 1578–1598. <https://doi.org/10.1093/heapro/daaa157>

O'Boyle, C., Haley, M. J., Lemarchand, E., Smith, C. J., Allan, S. M., Konkel, J. E., & Lawrence, C. B. (2020). Ligature-induced periodontitis induces systemic inflammation but does not alter acute outcome after stroke in mice. *International Journal of Stroke*, 15(2), 175–187. <https://doi.org/10.1177/1747493019834191>

OMS. (2001). Carta de Ottawa para la Promoción de la Salud. *Salud Pública Educ Salud*, 1(1), 19–22.

Pan, W., Wang, Q., & Chen, Q. (2019). The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *International Journal of Oral Science*, 11(3), 30. <https://doi.org/10.1038/s41368-019-0064-z>

Pereira, S. S. C., Araujo, G. F., de Queiroz, L. N., Câmara, P. R., Pascoal, V. D. B., Azevedo, R. S., & Robbs, B. K. (2019). An alternative, easy and reproducible method of stabilization and ligature-induced periodontitis in mouse. *MethodsX*, 6, 2156–2165. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.09.004>

Peres, M. A., Macpherson, L. M. D., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M. R., Listl, S., Celeste, R. K., Guarnizo-Herreño, C. C., Kearns, C., Benzian, H., Allison, P., & Watt, R. G. (2019). Oral diseases: A global public health challenge. *The Lancet*, 394(10194), 249–260. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31146-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31146-8)

Perillo, L., d'Apuzzo, F., Illario, M., Laino, L., Di Spigna, G., Lepore, M., & Camerlingo, C. (2020). Monitoring Biochemical and Structural Changes in Human Periodontal Ligaments during Orthodontic Treatment by Means of Micro-Raman Spectroscopy. *Sensors*, 20(2), 497. <https://doi.org/10.3390/s2002049>

Pessolano, L. G., Kramer, C. D., Simas, A., Weinberg, E. O., Genco, C. A., & Schreiber, B. M. (2020). Periodontal Disease and Birth Outcomes: Are We Missing Something? *Current Oral Health Reports*, 7(1), 62–71. <https://doi.org/10.1007/s40496-020-00255-5>

Petersen, P. E. (2003). The World Oral Health Report 2003: Continuous improvement of oral health in the 21st century - the approach of the WHO Global Oral Health Programme: The World Oral Health Report 2003. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 31, 3–24. <https://doi.org/10.1046/j..2003.com122.x>

Preshaw, P. M., Alba, A. L., Herrera, D., Jepsen, S., Konstantinidis, A., Makrilakis, K., & Taylor, R. (2012). Periodontitis and diabetes: A two-way relationship. *Diabetologia*, 55(1), 21–31. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2342-y>

Rojas, C., García, M. P., Polanco, A. F., González-Osuna, L., Sierra-Cristancho, A., Melgar-Rodríguez, S., Cafferata, E. A., & Vernal, R. (2021). Humanized Mouse Models for the Study of Periodontitis: An Opportunity to Elucidate Unresolved Aspects of Its Immunopathogenesis and Analyze New Immunotherapeutic Strategies. *Frontiers in Immunology*, 12, 663328. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.663328>

Sedghi, L. M., Bacino, M., & Kapila, Y. L. (2021). Periodontal Disease: The Good, The Bad, and The Unknown. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 766944. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.766944>

Shi, J., Fan, J., Su, Q., & Yang, Z. (2019). Cytokines and Abnormal Glucose and Lipid Metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 703. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00703>

Snider, A. P., & Wood, J. R. (2019). Obesity induces ovarian inflammation and reduces oocyte quality. *Reproduction*, 158(3), R79–R90. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0583>

Suh, J. S., Kim, S., Boström, K. I., Wang, C.-Y., Kim, R. H., & Park, N.-H. (2019). Periodontitis-induced systemic inflammation exacerbates atherosclerosis partly via endothelial-mesenchymal transition in mice. *International Journal of Oral Science*, 11(3), 21. <https://doi.org/10.1038/s41368-019-0054-1>

Thomas, V., Uppoor, A., Pralhad, S., Naik, D., & Kushtagi, P. (2018). Towards a common etiopathogenesis: Periodontal disease and endometriosis. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 11(3), 269. https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_8_18

Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, S149–S161. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12945>

Vasconcelos, D. F. P., Pereira da Silva, F. R., Pinto, M. e S. C., Santana, L. de A. B., Souza, I. G., Miranda de Souza, L. K., Oliveira, N. C. M., Ventura, C. A., Novaes, P. D., Barbosa, A. L. dos R., Medeiros, J.-V. R., Mikolasevic, I., Mani, A., & Soares de Oliveira, J. (2017). Decrease of Pericytes is Associated With Liver Disease Caused by Ligature-Induced Periodontitis in Rats. *Journal of Periodontology*, 88(2), e49–e57. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160392>

Wang, J., Zhou, Y., Ren, B., Zou, L., He, B., & Li, M. (2021). The Role of Neutrophil Extracellular Traps in Periodontitis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 639144. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.639144>

Watt, R. G. (2005). Strategies and approaches in oral disease prevention and health promotion. *Bulletin of the World Health Organization*, 83(9), 711–718. <https://doi.org/S0042-96862005000900018>

Wechsler, M. E., Munitz, A., Ackerman, S. J., Drake, M. G., Jackson, D. J., Wardlaw, A. J., Dougan, S. K., Berdnikovs, S., Schleich, F., Matucci, A., Chanez, P.,

Prazma, C. M., Howarth, P., Weller, P. F., & Merkel, P. A. (2021). Eosinophils in Health and Disease: A State-of-the-Art Review. *Mayo Clinic Proceedings*, 96(10), 2694–2707. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2021.04.025>

Wu, Y.-H., Taya, Y., Kuraji, R., Ito, H., Soeno, Y., & Numabe, Y. (2020). Dynamic microstructural changes in alveolar bone in ligature-induced experimental periodontitis. *Odontology*, 108(3), 339–349. <https://doi.org/10.1007/s10266-019-00471-1>

Yang, T., Zhao, J., Liu, F., & Li, Y. (2022). Lipid metabolism and endometrial receptivity. *Human Reproduction Update*, 28(6), 858–889. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmac026>

Yildiz Telatar, G., Gürlek, B., & Telatar, B. C. (2021). Periodontal and caries status in unexplained female infertility: A case–control study. *Journal of Periodontology*, 92(3), 446–454. <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0394>

Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., & Vanderpoel, S. (2009). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*. *Fertility and Sterility*, 92(5), 1520–1524. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.009>

Zhang, Y., Feng, W., Li, J., Cui, L., & Chen, Z.-J. (2022). Periodontal Disease and Adverse Neonatal Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Pediatrics*, 10, 799740. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.799740>

Proposta de Tese - Aprovação  

AE AGIR - EGASMONIZ <egasmoniz@myagir.pt>     

Para: Ana Clara da Cruz Pimenta
Cc: Vanessa Machado

Caro Ana Clara da Cruz Pimenta

O fluxo de proposta PT-68/22 do Ana Clara da Cruz Pimenta foi finalizado e a proposta encontra-se aprovada.

[Recebi-o!](#) [Adoro!](#) [Parece fantástico.](#)

Anexo 3 – Aprovação de utilização de imagem referente à Figura 1.

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Monitoring Biochemical and Structural Changes in Human Periodontal Ligaments during Orthodontic Treatment by Means of Micro-Raman Spectroscopy

Letizia Perillo ¹, Fabrizia d'Apuzzo ¹, Maddalena Illario ², Luigi Laino ¹, Gaetano Di Spigna ², Maria Lepore ³, Carlo Camerlingo ⁴

Affiliations + expand

PMID: 31952367 PMID: [PMC7014419](#) DOI: [10.3390/s20020497](#)

[Free PMC article](#)

Open Access Article

All articles published by MDPI are made immediately available worldwide under an open access license. No special permission is required to reuse all or part of the article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Commons CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is properly cited. For more information, please refer to <https://www.mdpi.com/openaccess>.

Human Periodontal
of Micro-Raman

Luigi Laino ¹,

¹ Dipartimento Multidisciplinare di Specialità Medico-Chirurgiche e Odontoiatriche, Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, 80138 Napoli, Italy

² Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università degli Studi di Napoli Federico II, 80131 Napoli, Italy

³ Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, 80138 Napoli, Italy

⁴ CNR-SPIN, Istituto Superconduttori, Materiali Innovativi e Dispositivi, 80078 Pozzuoli, Italy

* Author to whom correspondence should be addressed.

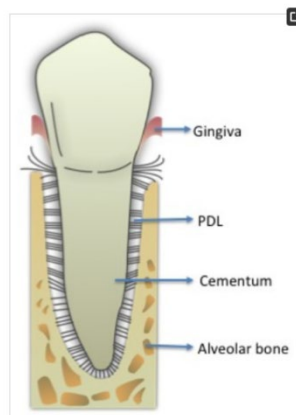


Figure 1. Periodontium with its components: gingiva, periodontal fibers (PDL) and cementum around the tooth root, alveolar bone supporting the tooth.

Anexo 4 – Aprovação de utilização de imagem referente à Figura 2.

This Agreement between Instituto Universitário Egas Moniz – Ana Clara Pimenta ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5458820142346 [Printable Details](#)

License date Dec 30, 2022

Licensed Content	Order Details
Licensed Content Publisher Springer Nature	Type of Use Thesis/Dissertation
Licensed Content Publication Nature Reviews Immunology	Requestor type academic/university or research institute
Licensed Content Title Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation	Format print and electronic
Licensed Content Author George Hajishengallis	Portion figures/tables/illustrations
Licensed Content Date Dec 23, 2014	Number of figures/tables/illustrations 1
	High-res required no
	Will you be translating? no
	Circulation/distribution 1 - 29
	Author of this Springer Nature content no

About Your Work	Additional Data
Title EFETO DA INDUÇÃO DE PERIODONTITE NOS ÓRGÃOS REPRODUTORES FEMININOS E INFLAMAÇÃO SISTÊMICA EM RATOS	Portions Figura 2
Institution name Instituto Universitário Egas Moniz	
Expected presentation date Jul 2023	

Requestor Location	Tax Details
Instituto Universitário Egas Moniz Rua da Cerâmica, nº22	
Requestor Location Benedita, 2475-011 Portugal Attn: Instituto Universitário Egas Moniz	

Price
Total 0.00 EUR

Anexo 5 – Aprovação de utilização de imagem referente à Figura 3.

OPEN ACCESS PEER-REVIEWED CHAPTER

Pathogenesis of Periodontal Disease

WRITTEN BY

José Luis Muñoz-Carrillo, Viridiana Elizabeth Hernández-Reyes, Oscar Eduardo García-Huerta, Francisca Chávez-Ruvalcaba, María Isabel Chávez-Ruvalcaba, Karla Mariana Chávez-Ruvalcaba and Lizbeth Díaz-Alfaro

Submitted: April 5th, 2019 , Reviewed: April 26th, 2019 , Published: June 6th, 2019

DOI: 10.5772/intechopen.86548

WRITTEN BY

José Luis Muñoz-Carrillo, Viridiana Elizabeth Hernández-Reyes, Oscar Eduardo García-Huerta, Francisca Chávez-Ruvalcaba, María Isabel Chávez-Ruvalcaba, Karla Mariana Chávez-Ruvalcaba and Lizbeth Díaz-Alfaro

Submitted: April 5th, 2019 , Reviewed: April 26th, 2019 , Published: June 6th, 2019

[REGISTER TO DOWNLOAD FOR FREE](#) [Share](#) [Cite](#)

© 2019 The Author(s). Licensee IntechOpen. This chapter is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 3.0 License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Anexo 6 - Aprovação de utilização de imagem referente à Figura 4.

This Agreement between Instituto Universitário Egas Moniz ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5458831167274 [Printable Details](#)

License date Dec 30, 2022

Licensed Content	Order Details
Licensed Content Publisher Springer Nature	Type of Use Thesis/Dissertation
Licensed Content Publication Nature Reviews Immunology	Requestor type academic/university or research institute
Licensed Content Title Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities	Format print and electronic
Licensed Content Author George Hajishengallis et al	Portion figures/tables/illustrations
Licensed Content Date Jan 28, 2021	Number of figures/tables/illustrations 1
	High/res required no
	Will you be translating? no
	Circulation/distribution 1 - 29
	Author of this Springer Nature content no

About Your Work	Additional Data
Title EFEITO DA INDUÇÃO DE PERIODONTITE NOS ÓRGÃOS REPRODUTORES FEMININOS E INFLAMAÇÃO SISTÊMICA EM RATOS	Portions Figura 4
Institution name Instituto Universitário Egas Moniz	
Expected presentation date Jul 2023	

Requestor Location	Tax Details
Requestor Location Instituto Universitário Egas Moniz Rua da Cerâmica, nº22	
Requestor Location Benedita, 2475-011 Portugal Atm: Instituto Universitário Egas Moniz	

Price
Total 0.00 EUR

Anexo 7 – Aprovação de utilização de imagem referente à Figura 5.

Please review the order details and the associated terms and conditions.

No royalties will be charged for this reuse request although you are required to obtain a license and comply with the license terms and conditions. To obtain the license, click the Accept button below.

Licensed Content	Order Details
Licensed Content Publisher Springer Nature	Type of Use Thesis/Dissertation
Licensed Content Publication Current Oral Health Reports	Requestor type academic/university or research institute
Licensed Content Title Periodontal Disease and Birth Outcomes: Are We Missing Something?	Format print
Licensed Content Author Lawrence G. Pessolano Jr et al	Portion figures/tables/illustrations
Licensed Content Date Feb 12, 2020	Number of figures/tables/illustrations 1
	High/res required no
	Will you be translating? no
	Circulation/distribution 1 - 29
	Author of this Springer Nature content no

About Your Work	Additional Data
Title EFEITO DA INDUÇÃO DE PERIODONTITE NOS ÓRGÃOS REPRODUTORES FEMININOS E INFLAMAÇÃO SISTÊMICA EM RATOS	Portions Figura 5
Institution name Instituto Universitário Egas Moniz	
Expected presentation date Jul 2023	

Requestor Location	Tax Details
Requestor Location Instituto Universitário Egas Moniz Rua da Cerâmica, nº22	
Requestor Location Benedita, 2475-011 Portugal Atm: Instituto Universitário Egas Moniz	

Price
Total 0.00 EUR

Anexo 8 – Aprovação de utilização de imagem referente à Figura 6.

This Agreement between Instituto Universitário Egas Moniz -- Ana Clara Pimenta ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number	5458801386978	Printable Details	
License date	Dec 30, 2022		
Licensed Content		Order Details	
Licensed Content Publisher	Springer Nature	Type of Use	Thesis/Dissertation
Licensed Content Publication	Odontology	Requestor type	academic/university or research institute
Licensed Content Title	The optimization of ligature/bone defect-induced periodontitis model in rats	Format	print and electronic
Licensed Content Author	Jingyi Gao et al	Portion	figures/tables/illustrations
Licensed Content Date	Jun 3, 2022	Number of figures/tables/illustrations	1
		Will you be translating?	no
		Circulation/distribution	1 - 29
		Author of this Springer Nature content	no
About Your Work		Additional Data	
Title	EFEITO DA INDUÇÃO DE PERIODONTITE NOS ORGÃOS REPRODUTORES FEMININOS E INFLAMAÇÃO SISTÊMICA EM RATOS	Portions	Figura 5
Institution name	Instituto Universitário Egas Moniz		
Expected presentation date	Jul 2023		
Requestor Location		Tax Details	
	Instituto Universitário Egas Moniz Rua da Cerâmica, nº22		
Requestor Location	Benedita, 2475-011 Portugal Attn: Instituto Universitário Egas Moniz		
\$ Price			
Total	0.00 EUR		