

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

EFEITOS LOCAIS E SISTÉMICOS PRODUZIDOS EM DIEFRENTES MODELOS DE INDUÇÃO DE PERIODONTITE: ESTUDO *IN VITRO* EM RATOS

Trabalho submetido por
Priscila Hália Oliveira
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Junho de 2023

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

EFEITOS LOCAIS E SISTÉMICOS PRODUZIDOS EM DIFERENTES MODELOS DE INDUÇÃO DE PERIODONTITE: ESTUDO *IN VITRO* EM RATOS

Trabalho submetido por
Priscila Hália Oliveira
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Junho de 2023

Dedicatória

Ao homem da minha vida, Gonçalo

“Quando eu tinha 5 anos de idade, minha mãe disse-me que a felicidade era a chave para a vida. Quando eu fui para a escola, eles perguntaram-me o que eu queria ser quando crescesse. Eu escrevi ‘feliz’. Eles me disseram que eu não entendi a tarefa, e eu disse a eles que eles não entendiam a vida” – **John Lennon**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Doutora Vanessa Machado, que eu admiro como pessoa e profissional, agradeço o incansável apoio, motivação e a oportunidade de ter integrado um projeto de investigação com um tema que me é tão inspirador. Fui um privilégio trabalhar com uma pessoa que dedica-se por inteiro e transmite todo o seu conhecimento científico. Agradeço todos os conselhos, confiança e amizade construída.

Ao Prof. Doutor João Botelho, pelo apoio, empenho e dedicação em todas as etapas desta investigação.

Ao Prof. Paulo Sobral Mascarenhas, pela dedicação e contribuição valiosa nesta investigação.

Ao Prof. Doutor José João Mendes que sempre esteve disposto a ajudar os alunos em prol do desenvolvimento académico e pessoal.

A todos os docentes que fizeram parte da minha trajetória académica e que sempre instigaram para melhorar como profissional, inculcando a responsabilidade que temos perante a sociedade, enquanto profissionais de saúde.

Ao Instituto Universitário, Univille em Santa Catarina, Brasil, onde comecei a apaixonar-me pela área e ao Instituto Universitário Egas Moniz por permitir obter a minha tão desejada formação académica e crescimento pessoal ao longo destes anos. Ambas as instituições têm a minha admiração e são sem dúvida universidades que preparam o aluno para a vida!

Ao amor da minha vida, ao meu marido Gonçalo por sempre encorajar-me a realizar um dos maiores sonhos da minha vida. É o realizar de um sonho, que o teu carinho e incentivo durante este período foram essenciais, *thank you for loving me*.

Aos meus pais que, desde cedo ensinaram-me o valor da educação para entender o mundo e que me mostraram, que não há limites para a busca de um sonho, para se querer sempre mais da vida e ser feliz.

RESUMO

Objetivo: Comparar os efeitos locais e sistêmicos produzidos por dois modelos de indução de periodontite *in vitro* em ratos, pelo método de ligadura e injeção gengival de lipopolissacarídeo (LPS) de *Porphyromonas gingivalis* (*P. Gingivalis*).

Materiais e métodos: Estudo experimental, efetuado numa amostra de 28 ratos fêmea Wistar. Aleatoriamente foram distribuídos em três grupos, o controlo (n=12), e os grupos experimentais com periodontite induzida por ligadura (n=5) durante 21 dias e outro com periodontite induzida por injeção de LPS de *P. gingivalis* (n= 11) durante 14 dias. O processo inflamatório no periodonto e órgãos reprodutores femininos foi avaliado por análise histológica. Os níveis séricos de hemograma, hormonas sexuais e parâmetros inflamatórios foram medidos. Todas as avaliações histológicas e sanguíneas foram realizadas por patologistas experientes que desconheciam o status da amostra. A análise estatística foi realizada com nível de significância $p\text{-value} \leq 0,05$.

Resultados: No geral, o grupo de periodontite induzida por ligadura apresentou contagens de linfócitos ($82,62\% \pm 4,39$) e IgG ($93,32 \pm 20,7$) mais altas e leucócitos ($2,18\% \pm 0,52$) e neutrófilos ($15,76\% \pm 4,68$) mais baixas, do que os grupos de periodontite induzida por injeção de LPS e o controlo. O grupo de periodontite induzida por ligadura foi significativamente diferente dos outros grupos. A inflamação no útero, identificada na amostra pela técnica de ligadura, mostra uma possível relação com alterações no útero de ratos fêmeas Wistar com periodontite crónica.

Conclusão: O grupo com periodontite induzida por ligadura, mostra que o método induziu maior destruição periodontal comparativamente com o protocolo de indução com LPS e tiveram um potencial impacto nas doenças inflamatórias sistêmicas, tanto a nível sanguíneo como a nível histológico inflamatório.

Palavras-Chave: Periodontite, Rato, Periodontite induzida por ligadura, Periodontite induzida por injeção de LPS de *P. gingivalis*.

ABSTRACT

Objective: To compare the local and systemic effects produced by two models of in vitro periodontitis induction in rats, by the method of ligation and gingival injection of lipopolysaccharide (LPS) from *Porphyromonas gingivalis* (*P. Gingivalis*).

Materials and methods: Experimental study, performed on a sample of 28 female Wistar rats. They were randomly distributed into three groups, the control (n=12), and the experimental groups with periodontitis induced by ligature (n=5) for 21 days and another with periodontitis induced by injection of *P. gingivalis* LPS (n=11) for 14 days. The inflammatory process in the periodontium and female reproductive organs was evaluated by histological analysis. Serum blood count levels, sex hormones and inflammatory parameters were measured. All histological and blood assessments were performed by experienced pathologists who were blinded to sample status. Statistical analysis was performed with a significance level of p-value ≤ 0.05 .

Results: Overall, the ligature-induced periodontitis group had higher lymphocyte ($82.62\% \pm 4.39$) and IgG (93.32 ± 20.7) and white blood cell ($2.18\% \pm 0.52$) and neutrophils ($15.76\% \pm 4.68$) lower than the LPS injection-induced periodontitis and control groups. The ligation-induced periodontitis group was significantly different from the other groups. Inflammation in the uterus, identified in the sample by the ligation technique, shows a possible relationship with alterations in the uterus of female Wistar rats with chronic periodontitis.

Conclusion: The ligature-induced periodontitis group shows that the method induced greater periodontal destruction compared to the LPS induction protocol and had a potential impact on systemic inflammatory diseases, both at the blood level and at the inflammatory histological level.

Keywords: Periodontitis, Rat, Ligature induced-periodontitis, Periodontitis induced by injection of *P. gingivalis* LPS.

Índice Geral

I. INTRODUÇÃO	15
1. Saúde Periodontal.....	15
2. Doença Periodontal	17
3. Fatores de risco da periodontite	19
4. Epidemiologia da periodontite	21
5. Manifestações locais e sistêmicas da periodontite	23
6. Métodos de indução de periodontite <i>in vitro</i> em ratos	29
7. Objetivos	31
II. MATERIAS E MÉTODOS	33
1. Considerações éticas	33
2. Protocolo clínico de indução de periodontite	33
3. Alterações histopatológicas do periodonto	34
4. Recolha de sangue e análises laboratoriais	35
5. Análise estatística	38
III. RESULTADOS	41
1. Análises laboratoriais	41
2. Alterações histopatológicas do periodonto, trompas, ovários e útero	44
IV. DISCUSSÃO.....	47
V. CONCLUSÃO.....	55
VI. BIBLIOGRAFIA.....	57

ANEXOS

Índice de figuras

Figura 1- Modelo de SP influenciado por três camadas (camada interna: condições que afetam diretamente o periodonto; camada intermédia: fatores ambientais e sistêmicos; camada externa: fatores gerais e modificáveis). Adaptado de Murakami et al., 2018.	17
Figura 2 - Sinergia polimicrobiana e disbiose na periodontite. Adaptado de Hajishengallis, 2015.....	24
Figura 3- Relação da DP e doenças sistêmicas. Adaptado de Hajishengallis & Chavakis, 2021.....	28
Figura 4- Proposta de uma metodologia para induzir periodontite em ratos fêmea Wistar pelas técnicas de ligadura e por injeção de LPS de <i>P. gingivalis</i>	34
Figura 5- Analisador hematológico da Série-XN com tecnologia avançada, utiliza três sinais: dispersão frontal de luz (FSC), dispersão lateral de luz (SSC) e a luz de fluorescência lateral (SFL) (Sysmex, 2012a).....	37
Figura 6- Metodologia SAFLAS: analisa em detalhes as populações de linfócitos e monócitos (Sysmex, 2012a).....	37
Figura 7- A imagem ilustra mostra como populações diferentes de células, particularmente monócitos e linfócitos, podem ser separadas usando a análise da densidade populacional e dispersão lateral de luz vs. fluorescência (Sysmex, 2012a).	38

Índice de tabelas

Tabela 1 – Valores de referência para relacionar com o grau de inflamação e necrose...	35
Tabela 2 - Valores obtidos dos parâmetros laboratoriais para as amostras submetidas à indução de periodontite, pelos métodos de indução com ligadura por 21 dias e com injeção de LPS de <i>P. gingivalis</i> durante 14 dias, e na amostra controle.....	42
Tabela 3 - Parâmetros histopatológicos da inflamação e/ou necrose no periodonto, trompas, ovários e útero, obtidos nas amostras submetidas à indução de periodontite, pelos métodos de indução com ligadura por 21 dias e com injeção de LPS de <i>P. gingivalis</i> durante 14 dias, e na amostra controle.....	45

Índice de gráficos

Gráfico 1 - Parâmetros sanguíneos de inflamação avaliados para cada um dos três grupos de análise (grupo com periodontite induzida com LPS, grupo com periodontite induzida com ligadura e grupo controle)43

Gráfico 2 - Parâmetros histopatológicos do tipo e quantidade de inflamação encontrada no periodonto e útero, para cada um dos três grupos de análise (grupo com periodontite induzida com LPS, grupo com periodontite induzida com ligadura e grupo controle)46

Lista de abreviaturas

BP - Bolsas periodontais

CiiEM - Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz

DCV - Doenças cardiovasculares

DGAV - Direção Geral de Medicina Veterinária

DM - Diabetes *mellitus*

DNA - Desoxirribonucleico

DP - Doença periodontal

FCG -Fluido crevicular gengival

FSC - Dispersão frontal de luz

HCT - Hematócrito

HGB - Hemoglobina

IC - Intervalo de confiança

IgG - Imunoglobulina G

IL1 β - Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

IPF - Fração Imatura de Plaqueta

IRF - Fração Imatura dos Reticulócitos

JAC - Junção amelocementária

LPS - Lipopolissacarídeos bacterianos

MOs - Microorganismos

NIC - Nível de inserção clínica

NRBC- Eritroblastos

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - Proteína-C reativa

PETIT - Periodontal Health and Fertility in Rats

PLT-F - Canal de plaqueta fluorescente

PLT-I – Plaquetas pela impedância e foco hidrodinâmico

PS - profundidade de sondagem

SFL - Luz de fluorescência lateral

SI - sistema imunológico

SOP - Síndrome dos ovários policísticos

SP - Saúde periodontal

SSC - Dispersão lateral de luz

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa (*tumor necrosis factor- α*)

TPNC - Terapia periodontal não cirúrgica

RBC – Eritrócitos

RET - Canal de reticulócitos

RET-He - Conteúdo de Hemoglobina nos Reticulócitos

RNA- Ribonucleico

VB - vaginose bacteriana

WDF - Canal de determinação diferencial de células leucocitárias

WNR - Canal de células leucocitárias nucleadas

I. INTRODUÇÃO

1. Saúde Periodontal

O periodonto é uma estrutura dinâmica, sendo classificado em periodonto de proteção (gengiva e mucosa alveolar) e periodonto de sustentação (ligamento periodontal, cemento e osso alveolar) (Borgo et al., 2014). Um periodonto saudável, tem como principal função, a inserção do dente no tecido ósseo dos maxilares e manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória da cavidade oral (Lindhe e Lang, 2015). O conhecimento da sua arquitetura e definição de saúde periodontal (SP) são pré-requisitos para avaliar a presença ou ausência da doença periodontal (DP) (Schroeder & Listgarten, 1997).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a “saúde é um estado de completo bem-estar físico, mental e social e não meramente a ausência de doença ou enfermidade” (WHO, 2018). Dessa forma a SP pode ser definida através da ausência de inflamação associada à gengivite ou periodontite (Lang & Bartold, 2018). A SP pode ser analisada tanto a nível clínico como histológico. Existem 4 categorias para avaliar a SP, que correlacionam se o periodonto tem inserção normal e nível ósseo ou suporte reduzido, assim como, a possibilidade de conter fatores modificadores e resultados relativos do tratamento. Esses 4 níveis incluem: 1) o periodonto intacto, com suporte normal, sem inserção ou perda óssea e apresenta ausência total de inflamação clínica e vigilância imunológica fisiológica); 2) SP clínica: periodonto com suporte normal, contém níveis mínimos de inflamação clínica; 3) estabilidade da DP, num periodonto reduzido; 4) remissão/controlo da DP, num periodonto reduzido (Lang & Bartold, 2018; Murakami et al., 2018).

Os níveis 3 e 4, segundo a nova classificação da DP, caracterizam por um periodonto reduzido, no entanto, o nível 3 pode diferenciar-se do nível 4, através da capacidade de conter os fatores de risco modificáveis e obter uma resposta terapêutica ótima, com uma inflamação mínima, sendo um indicador de sucesso para o tratamento da periodontite (Lang & Bartold, 2018; Murakami et al., 2018). O principal objetivo do tratamento é restabelecer a SP, a partir do controlo da inflamação e infeção, e para tal é necessário controlar os fatores de risco modificáveis. No entanto, em pacientes que têm

a doença há muitos anos, pode ser aceite como objetivo terapêutico alternativo a remissão/controlo da progressão da DP (nível 4) (Lang & Bartold, 2018; Murakami et al., 2018).

A SP pode ser afetada por fatores de risco modificáveis, de condição comportamental ou ambiental (por exemplo, diabetes mellitus (DM), doenças cardiovasculares, microorganismos [MOs] específicos, obesidade, síndrome metabólica, stress e tabaco) passíveis de controlo por parte do médico dentista e/ou pelo doente, e não modificáveis ou determinantes (por exemplo, fatores genéticos, distúrbios hematológicos e status socioeconómico), que por serem intrínsecos ao indivíduo, são mais difíceis de serem modificados (Botelho et al., 2019; Curtis et al., 2020; D’Aiuto et al., 2006; Hajishengallis, 2015; Lin et al., 2021; Mark Bartold & Van Dyke, 2013; Muñoz Aguilera et al., 2020; Sanz et al., 2019).

Na nova classificação da DP foi introduzido o conceito de SP e de condições/doenças peri-implantares, e substitui-se os termos “crónica” e “agressiva” para qualificar a periodontite, passando-se então a definir a doença segundo diferentes estádios e graus (Caton et al., 2018; Tonetti et al., 2018).

A nova classificação divide-se em dois grupos: condições/doenças periodontais e condições/doenças peri-implantares. Com base na gravidade, complexidade da periodontite (profundidade de bolsa, defeitos intraósseos, envolvimento de furca, mobilidade dentária, disfunção mastigatória), é possível classificar o estágio I a IV e ainda estabelecer a extensão (localizada ou generalizada). Após o estágio, estabelece-se o grau (indicador da taxa de progressão da doença), com evidência direta ou indireta da taxa de progressão em três categorias: progressão lenta, moderada e rápida (Grau A, B e C) (Tonetti et al., 2018).

Uma grande alteração nesta classificação foi a introdução dos fatores de risco como modificadores de grau, uma vez que estudos clínicos e epidemiológicos realizados em diferentes populações, demonstraram maior gravidade, progressão e prevalência de periodontite em fumadores e diabéticos (Holde et al., 2017; Preshaw et al., 2012).

Um fator de risco caracteriza-se como uma característica relacionada ao aumento da taxa de incidência de uma doença, e não necessariamente à sua etiologia (Knight et al., 2016; Van Dyke & Sheilesh, 2006). Os diversos fatores, que podem interferir com a SP, estão demonstrados na figura 1 e foram distribuídos por três camadas, sendo a mais

interna referente a condições biológicas, que têm efeito direto sobre o periodonto, a camada intermédia contempla os fatores ambientais e sistêmicos, e a camada mais externa representa condições gerais e modificáveis. Este modelo demonstra que para adquirir a estabilidade e bem-estar periodontal é necessário considerar e controlar os diversos fatores sistêmicos, biológicos, económicos, sociais e psicológicos (Lang & Bartold, 2018; Murakami et al., 2018).



Figura 1- Modelo de SP influenciado por três camadas (camada interna: condições que afetam diretamente o periodonto; camada intermédia: fatores ambientais e sistêmicos; camada externa: fatores gerais e modificáveis). Adaptado de Murakami et al., 2018.

2. Doença Periodontal

A DP é uma patologia oral que afeta os tecidos de suporte dentário, nomeadamente a gengiva, o ligamento periodontal, o cemento e o osso alveolar. Na sua fase inicial, manifesta-se por uma inflamação reversível dos tecidos moles, designada como gengivite, podendo evoluir para a destruição gradual dos tecidos de suporte dentário e, consequentemente, à perda dentária, sendo designada por periodontite (Carvalho et al., 2021; Kurt et al., 2019).

Clinicamente, a periodontite pode ser definida por uma inflamação microbiana mediada pelo hospedeiro que conduz a uma perda de inserção periodontal. Com uma sonda periodontal padronizada, tendo como referência a junção amelocementária (JAC), é possível detetar o nível de inserção clínica (NIC) pela avaliação circunferencial da dentição erupcionada (Darveau R., 2010; Tonetti et al., 2018). A identificação clínica

difere com base na distribuição, gravidade e localização de lesões na arcada dentária (Hajishengallis, 2015; Trombelli et al., 2018).

Um periodonto intacto é caracterizado por um sulco gengival de menor ou igual a 3 mm de profundidade de sondagem, a gengivite é definida por um sulco gengival de menor ou igual a 3 mm de profundidade de sondagem, associado a uma inflamação periodontal moderada sem perda óssea, e a periodontite é estabelecida quando a formação das bolsas periodontais (BP) têm ≥ 4 mm de profundidade de sondagem e há presença de resposta inflamatória severa com perda óssea alveolar. As enzimas induzidas pela inflamação podem levar à perda de tecido periodontal, ao aumento e à ulceração das BP, podendo estas atingirem 10-12mm de profundidade. As BP atuam como reservatórios bacterianos, abrigando cerca de 10^8 - 10^{10} bactérias que se alimentam de resíduos inflamatórios (peptídeos de colagénio), que são conduzidos pelo fluido crevicular gengival (FCG) que circunda a bolsa (Hajishengallis, 2015; Trombelli et al., 2018).

A etiologia da periodontite é multifatorial, sendo o fator etiológico major a disbiose de placa bacteriana e das bactérias periodontopatogénicas, nomeadamente *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e espiroquetas (Costa et al., 2020). Associado à disbiose polimicrobiana existe uma resposta imune exacerbada do hospedeiro (Vargas-Sanchez et al., 2017). Consequentemente, nos tecidos gengivais existe um aumento das citocinas pró-inflamatórias (interleucina [IL]-6 e a IL-1 β), redução das citocinas anti-inflamatórias, aumento de radicais livres, da proteína-C reativa (PCR) e das enzimas hidrolíticas, que, no seu conjunto, desempenham um papel fulcral no processo inflamatório local com repercussões sistêmicas (Costa et al., 2020; Fogacci et al., 2017; Otenio et al., 2012; Vargas-Sanchez et al., 2017).

A presença de comunidades microbianas disbióticas, por si só pode não necessariamente conduzir à periodontite, mas pode induzir a doença no contexto de outros fatores de risco, como o genótipo do hospedeiro (estado imunoinflamatório intrínseco; polimorfismos que podem atenuar a inflamação e prevenir o desenvolvimento de patologia), stress, dieta ou hábitos (por exemplo, fumar) (Murakami et al., 2018).

É evidente que o biofilme microbiano é o fator etiológico major da inflamação gengival, e a extensão e gravidade da inflamação são afetadas por condições sistêmicas e fatores orais (Mark Bartold & Van Dyke, 2013).

Além disso, a placa acumula-se mais rapidamente em locais inflamados da gengiva do que em locais não inflamados, criando uma dinâmica complexa entre o biofilme da placa dentária e a resposta imunoinflamatória do hospedeiro (Darveau R., 2010). Assim, para evitar a perda de inserção e a destruição do tecido periodontal, ainda é essencial lidar com a gengivite por meio de intervenção terapêutica local apropriada.

Curiosamente, a disbiose bacteriana só induzirá à periodontite em hospedeiros suscetíveis, pois há indivíduos que permanecem periodontalmente saudáveis, mesmo com acumulação elevada de biofilme na estrutura dentária, enquanto, outros com menos formação de biofilme são extremamente suscetíveis à periodontite (Hajishengallis G., 2015).

3. Fatores de risco da periodontite

A compreensão da etiologia e patogênese da periodontite é crucial para desenvolver estratégias de prevenção e tratamento (Trombelli et al., 2018). Nesse enquadramento, fatores que alteram as respostas celulares, vasculares e de cicatrização, como o tabagismo, stress, controlo glicémico, dieta rica em hidratos de carbono e higiene oral inadequada, são fatores associados com o início e desenvolvimento da doença (Knight et al., 2016).

A periodontite tem uma etiologia complexa que age em diversos níveis: ao nível microbiano, fundamentada na presença de comunidades microbianas disbióticas com potencial para inflamação destrutiva; no nível do hospedeiro, com base em fatores genéticos que podem predispor ou proteger contra doenças; e no nível de saúde sistémica e fatores ambientais, que modificam a resposta do hospedeiro em uma ação protetora ou destrutiva (Hajishengallis G., 2015).

Segundo Ebersole et al. (2016), a etiologia da periodontite está associada ao dano tecidual, que ocorre inicialmente devido a uma resposta imune exacerbada do hospedeiro a patógenos subgengivais. A investigação de Botelho et al. (2019), identificou como fatores de risco extremamente impactantes para a periodontite, a idade, escolaridade, tabagismo e DM.

A idade e a quantidade de biofilme oral também influenciam a apresentação clínica da patologia (Tonetti et al., 2018).

O tabagismo desenvolve efeitos localmente no tecido periodontal, com destruição deste, conduzindo a modificação nas respostas inflamatória, imunes inata e adaptativa. O resultado do tabagismo é acumulativo, de forma que quanto maior a duração e frequência do hábito, maior será a destruição periodontal (J. Albandar & Rams, 2002). Desse modo, pode levar décadas para reduzir o risco da doença, mas cessar o hábito de fumar beneficia a SP do paciente, corroborando o conceito de que fumar é um verdadeiro fator modificador (Carvalho et al., 2021; Knight et al., 2016). A terapia periodontal não cirúrgica (TPNC) em pacientes com hábitos tabágicos tem menor impacto na redução da profundidade de sondagem (PS) e na melhora do nível de NIC, principalmente em locais com perda de inserção igual ou superior a 5 mm, do que em pacientes sem hábitos tabágicos. Este dado sugere que o tabagismo é um fator que compromete a cicatrização dos tecidos (Knight et al., 2016).

Ainda é desconhecida a influência da DM na periodontite, porque a presença de placa bacteriana é a principal causa da inflamação gengival, no entanto, diversos processos foram propostos para relacionar estas doenças, nomeadamente, alterações nos mecanismos celulares, vasculares e de cicatrização (Bui et al., 2019; Knight et al., 2016; Mark Bartold & Van Dyke, 2013). A periodontite em pacientes diabéticos pode ser descrita por inflamação aumentada e dano tecidual agravado, em comparação com os não diabéticos. E o desenvolvimento do dano periodontal, pode ser parcialmente atribuído à alteração induzida pela hiperglicemia, que conduz à ativação imune e inflamação (Zhang et al., 2021).

Perceber a base biológica da alteração das respostas de inflamação, imunidade inata e adaptativa, é fundamental para compreender os mecanismos responsáveis pelas transformações associadas à idade e sistema imunológico (SI), a fim de aperfeiçoar estratégias para manter uma boa SP na população (Ebersole et al., 2016; Murakami et al., 2018). O SI pode desenvolver resposta inflamatória, podendo esta ser protetora a estímulos nocivos (com participação de células imunes, vasos sanguíneos e diversos mediadores solúveis), com o objetivo de eliminar o dano nocivo e reparar o tecido. Ambas as inflamações, aguda e crónica, são respostas inespecíficas, ou seja, conduzidas pelo mecanismo de imunidade inata, e quando a função protetora contra a destruição tecidual não é efetiva, o estímulo nocivo continua a agir conduzindo à inflamação crónica, que pode proporcionar o desenvolvimento de diversas patologias, como a periodontite (Caton et al., 2018; Ebersole et al., 2016; Tonetti et al., 2015).

Segundo a OMS, a gravidez exprime-se por alterações fisiológicas complexas, que podem afetar a saúde oral e esta é crucial para a saúde geral da mulher e do bebé (WHO, 2016). As recomendações preventivas, diagnósticas e terapêuticas devem ser tomadas durante a gestação, afim de melhorar e manter a SP e estes procedimentos devem ser preferencialmente realizados durante o segundo trimestre (Sanz, et al., 2013; WHO, 2016). As evidências epidemiológicas têm sido analisadas com o intuito de relacionar o impacto da periodontite durante a gravidez, através de dois mecanismos biológicos que associam a presença de MOs orais e/ou seus componentes (impacto direto no feto pela da via placentária) e identificam mediadores inflamatórios (impacto indireto no feto pela da via placentária) na corrente sanguínea. Estes estudos manifestam que a periodontite materna direta e/ou indiretamente tem potencial para influenciar a saúde da unidade materno-fetal, podendo causar baixo peso ao nascer, parto prematuro e pré-eclâmpsia (Sanz, et al., 2013).

O médico dentista deverá realizar o aconselhamento de comportamento de saúde de suporte, incentivando as pacientes a vigiarem a sua saúde durante a gestação, a cessarem o tabagismo e a controlar o índice glicémico, para deste modo os fatores modificadores serem controlados, durante o tratamento integral do paciente (Carvalho et al., 2021; Knight et al., 2016). Com a realização deste tratamento geral é possível diminuir os custos diretos (relacionados ao tratamento) e indiretos (compreendem tanto as implicações orais, como carie radicular, perdas dentárias e reabilitação dentária, quanto a diminuição de produtividade) que a periodontite causa para a economia (Carvalho et al., 2021).

4. Epidemiologia da periodontite

As doenças orais são um grande desafio de Saúde Pública global, tendo uma alta prevalência e impactos negativos económicos significativos (Botelho et al., 2022), que consequentemente reduzem a qualidade de vida das pessoas afetadas (Holde et al., 2018; Peres et al., 2019). Estas patologias não tratadas afetam cerca de metade da população mundial e segundo a OMS, o número global aumentou em 1 bilhão nos últimos 30 anos (Chen et al., 2021), representando um aumento de 50%, sendo superior ao aumento populacional (45%) durante o mesmo período (WHO, 2022).

Globalmente, mais de 3,5 bilhões de indivíduos têm patologias orais que são crônicas, iniciando-se na infância e progredindo ao longo da vida adulta (WHO, 2022). Em diversos países de baixo nível sócio-económico, estas patologias permanecem sem tratamentos porque os seus custos excedem os recursos disponíveis. Consequentemente, a negligência de pacientes com estas enfermidades conduz a dor contínua, infecção generalizada e impacto negativo no bem-estar emocional, social e mental (Peres et al., 2019).

Segundo a OMS, a periodontite é um problema de saúde pública com elevada prevalência em adultos (15-20%), sendo considerada a segunda principal causa de patologia oral a nível mundial (WHO, 2018). De 1990 a 2019 o número estimado de casos de DP grave aumentou em quase 540 milhões, enquanto a prevalência global aumentou cerca de 24%, sendo que na Europa, o aumento de prevalência foi de 17,89% (WHO, 2022). A periodontite sendo uma doença comum entre os adultos, apresenta prevalência segundo estudos europeus e americanos variando de 31% a 76%, respetivamente (Holde et al., 2017). A periodontite severa, em 2010, foi considerada a sexta condição de saúde mais prevalente do mundo, atingindo 11,2% das pessoas, ou 743 milhões (Holde et al., 2018; Sanz et al., 2019).

Na Europa, o impacto da periodontite na saúde pública e os fatores de risco nas taxas de morbilidade e qualidade de vida da população, nem sempre são validados na literatura científica, devido à inexistência de um só método eficaz para um estudo epidemiológico entre regiões, países e global (Bourgeois et al., 2007). A primeira investigação de exame periodontal, na França, foi realizada pelo Bourgeois *et al.* (2007), com adultos, de idades entre 35–64 anos, sendo 51% mulheres, com idade mediana de 49,6 anos. A prevalência de perda de inserção severa foi de 32,31% (intervalo de confiança [IC] de 95%: 31,81–32,81) na faixa etária de 35–39 anos (Bourgeois et al., 2007).

Holtfreter et al. (2009) revelaram que a prevalência de periodontite, numa província da Alemanha, na faixa etária de 35-44 anos foi de 17,4%, sendo que na maioria dos casos apenas alguns dentes/locais foram severamente afetados. Outro parâmetro que foi observado nesse estudo refere-se à elevada prevalência da periodontite moderada (35,00%) e grave (6,25%) no grupo de 20-29 anos de idade. A condição periodontal foi avaliada com base na perda de inserção e profundidade de sondagem.

Na região Sul da Área Metropolitana de Lisboa (Portugal), em participantes com idade entre 18 e os 95 anos, sendo 617 mulheres/447 homens, a prevalência de periodontite foi de 59,9%, 22,2% e 24,0%, para periodontite nos estádios leve, moderado e severo, respetivamente (Botelho et al., 2019).

Em 2008, o Governo português criou o vale-dentista destinado a populações vulneráveis, incluindo grávidas, as quais tinham direito a 3 vouchers, para tratamento de cárie ativa. O impacto deste programa permitiu melhorar significativamente o acesso e cobertura dos cuidados dentários em Portugal, nos últimos dez anos, atingindo cerca de 3,3 milhões de utentes do Sistema Nacional de Saúde (Simões, et al., 2018). No entanto, os cuidados de saúde oral em Portugal têm sido prestados maioritariamente no setor privado, e ainda existe uma carência de serviços em hospitais públicos e cuidados domiciliários, à semelhança de outros países da união europeia (Grécia, Espanha e Itália) (Botelho et al., 2019; Simões et al., 2018).

Nas últimas três décadas, a nível global, observou-se um aumento da prevalência e gravidade da periodontite na população (GBD, 2020).

5. Manifestações locais e sistémicas da periodontite

A periodontite é uma doença inflamatória crónica multifatorial, caracterizada por uma inflamação gengival acentuada com um infiltrado celular inflamatório distinto e uma infinidade de mediadores pró-inflamatórios que não se limita apenas aos tecidos gengivais, mas também apresenta alterações sistémicas no hospedeiro (Botelho et al., 2021; Hajishengallis, 2015; Murakami et al., 2018).

Um novo modelo de patogénese da DP (figura 2) sugere a presença de disbiose e a sinergia polimicrobiana e não apenas a ação das bactérias anaeróbicas orais (*P. gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*), habitualmente envolvidas como agentes causadores de periodontite, existindo um efeito perturbador do biofilme devido a estes intervenientes (disbiose e sinergia polimicrobiana) (Hajishengallis, 2015; Trombelli et al., 2018).

O processo atual de patogénese da DP demonstra as diferenças e a progressão entre o estado de SP, de gengivite e de periodontite (figura 2a). Sendo desta forma evidente a presença de periodontite em hospedeiros suscetíveis, devido a uma

comunidade polimicrobiana, com distintos MOs que têm diferentes ações e que convergem sinergicamente para causar inflamação destrutiva, conforme está demonstrado na figura 2b (Hajishengallis, 2015). As bactérias comensais são os constituintes da microbiota disbiótica e na presença de patógenos inflamatórios, induzem a resposta inflamatória do hospedeiro, causando reabsorção do osso alveolar de suporte (Trombelli et al., 2018). A disbiose e a inflamação atuam de forma combinada porque os produtos da degradação do tecido inflamatório são usados como nutrientes pela microbiota disbiótica (Hajishengallis, 2015; Trombelli et al., 2018).

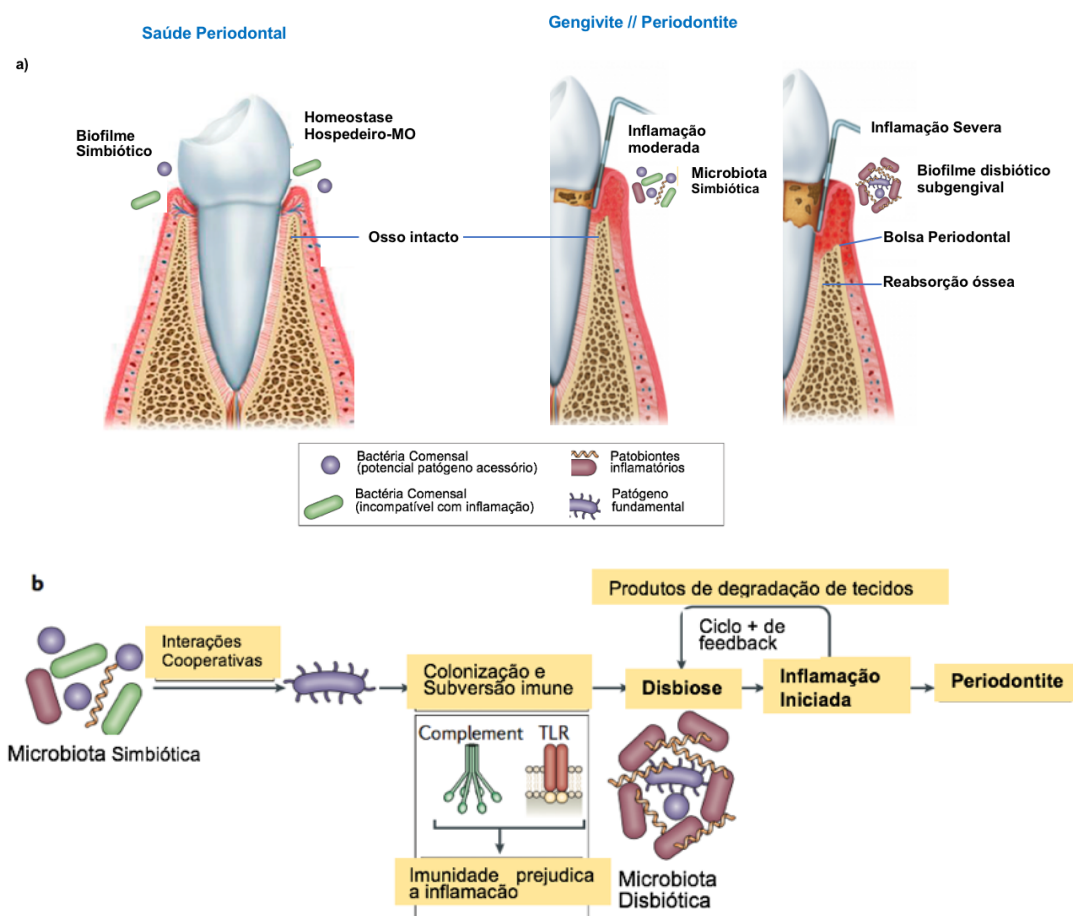


Figura 2 - Sinergia polimicrobiana e disbiose na periodontite. Adaptado de Hajishengallis, 2015.

A microflora associada à SP permanece estável ao longo do tempo e existe um estado de equilíbrio, de homeostase microbiana. Nesse contexto, o hospedeiro, por meio do SI inato, consegue controlar a placa subgengival, existindo níveis baixos de FCG sem produtos de degradação tecidual, que podem ser usados como nutrientes pela flora

subgengival. Porém, as respostas imune e inflamatória podem ser alteradas devido à acumulação de placa bacteriana, por fatores do hospedeiro independentes da placa (distúrbios imunológicos, alterações no equilíbrio hormonal ou doenças sistêmicas, como diabetes) ou por fatores ambientais (tabagismo, dieta e stresse). Consequentemente, a inflamação tecidual ocorre na presença do aumento do FCG com produtos de degradação tecidual e outros nutrientes bacterianos, conduzindo a uma mudança na composição da placa subgengival em direção a uma flora mais gram-negativa (associada à doença), culminando em periodontite evidente (Mark Bartold & Van Dyke, 2013).

A hipótese da placa ecológica, modelo que melhora a compreensão das interações entre as comunidades polimicrobianas e o SI do hospedeiro, durante a periodontite, relaciona espécies-chave que desempenham funções essenciais para toda a comunidade e mecanismos essenciais para a manutenção ou destruição do sistema de defesa inato no periodonto, que poderão identificar novos prognósticos ou caminhos terapêuticos (Darveau R., 2010).

Se a periodontite é uma interrupção da homeostase microbiana mediada pelo hospedeiro, então é lógico que, controlando a inflamação (usando terapia mecânica convencional e adjuntos farmacológicos), seja possível controlar a infecção (Mark Bartold & Van Dyke, 2013).

A monitorização da inflamação sistêmica ao longo dos anos tem sido possível, graças a uma variedade de biomarcadores celulares e circulantes entre os quais, contagem de glóbulos brancos e velocidade de hemossedimentação (Botelho et al., 2021).

Quando a inflamação aguda se resolve e ocorre uma resposta crônica, importantes implicações sistêmicas podem ocorrer, como doenças não transmissíveis (Botelho et al., 2021). Além disso, a periodontite tem sido associada a várias patologias sistêmicas (Bui et al., 2019; Jepsen et al., 2018).

A periodontite e certas patologias sistêmicas compartilham fatores etiológicos (genéticos e/ou ambientais) idênticos, e os mecanismos que associam estas doenças são consistentes com observações clínicas, nas quais relacionam a periodontite a inflamação sistêmica de baixo grau, bacteremias, alteração metabólica e disfunção endotelial (Albandar et al., 2018; Hajishengallis & Chavakis, 2021). No entanto, doenças sistêmicas como o DM2 podem aumentar a suscetibilidade à periodontite, uma vez que

desencadeiam inflamação no periodonto ou modelam o microbioma deste (Hajishengallis & Chavakis 2021).

A associação biológica entre DM e periodontite está bem evidenciada por suporte científico e na década de 1990, passou a ser caracterizada como a sexta complicação da DM (Knight et al., 2016). Tendo em vista a alta prevalência de ambas as patologias e as possíveis repercussões, o médico dentista deve recomendar visitas frequentes, de forma a controlar os fatores de risco, como a presença de placa bacteriana nas BP (Hajishengallis, 2015). Embora, os estudos comprovem a associação entre estas doenças, para efetuar um tratamento multidisciplinar, são necessários estudos microbiológicos, clínicos, bioquímicos e epidemiológicos, com elevada e adequada amostra, e com ensaio clínico randomizado e controlado (Bascones-Martínez et al., 2015; Preshaw et al., 2012).

Segundo Machado et al. (2020a), a periodontite pode ter um papel prejudicial na pressão arterial (PA), principalmente em pacientes com níveis elevados de inflamação gengival e BP profundas. Como a periodontite pode estar associada ao aumento do risco de hipertensão arterial, abordagens de tratamento periodontal que conduzam ao controle da PA e beneficiem os pacientes ao nível da saúde cardiovascular, proporcionam menor morbidade e mortalidade (Muñoz Aguilera et al., 2020; Sanz et al., 2019). Dados sugerem que o TPNC intensivo diminui os níveis lipídicos e os marcadores inflamatórios sistêmicos, reduzindo a PA sistólica e consequentemente o risco cardiovascular (D'Aiuto et al., 2006; Muñoz Aguilera et al., 2020).

Pacientes com periodontite contêm citocinas pró-inflamatórias séricas mais elevadas, assim como o fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β e IL-6 em comparação com controlos saudáveis. Por este motivo, a periodontite está relacionada com muitas doenças sistêmicas, como artrite reumatoide, DM e doenças cardiovasculares (DCV). Diversos estudos clínicos e epidemiológicos, demonstram uma relação evidente entre a periodontite e DCV, por meio de bactérias *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia*, ou *Treponema denticola*, que foram identificadas em 52% das amostras ateroscleróticas (Suh et al., 2019). E no tecido cardíaco, níveis elevados de citocinas inflamatórias, conduzem a atividade simpática aumentada e disfunção cardíaca (Lin et al., 2021; Suh et al., 2019). A atividade simpática foi relatada, sendo possível que a periodontite afete o sistema nervoso e no estudo de Lin *et al* (2021), com a utilização de ligadura prolongada (1 ano), os camundongos demonstraram sinais de comprometimento cognitivo.

A inflamação sistêmica resultante da periodontite interfere na atividade eritropoiética e altera o mecanismo de diferenciação de algumas células na medula óssea (MO). Embora ainda não seja consensual a associação da SP com os distúrbios sanguíneos, não havendo uma relação de maior predisposição à periodontite quando o paciente apresenta patologias sanguíneas (Botelho et al., 2021). Porém, indivíduos com distúrbios de leucócitos aparentam ser mais predispostos à deleção periodontal severa, por causa da fisiopatologia da periodontite e da função imune dos leucócitos (Botelho et al., 2021).

A periodontite é uma doença inflamatória de baixo grau, sendo medida pelos níveis de PCR e o seu tratamento induz à redução dos níveis séricos de PCR (Machado et al., 2021). Estudos demonstram que o TPNC intensivo provoca diminuição imediata da PCR e uma progressiva diminuição, enquanto, o TPNC não intensivo reduz consistentemente a PCR mesmo após 6 meses (Machado et al., 2021). A periodontite agressiva apresenta nos pacientes, cerca de 50% de níveis mais elevados de PCR do que a periodontite crônica (Machado et al., 2021).

Devido a uma quebra da homeostase polimicrobiana, a periodontite pode torna-se um fator de risco para fertilidade feminina e adicionalmente, a periodontite relaciona-se a fatores de risco, já evidenciados por pesquisas, para a infertilidade feminina, como a síndrome dos ovários policísticos (SOP), endometriose, vaginose bacteriana (VB) e resultados adversos na gravidez (Escalda et al., 2021; Machado, et al., 2020b; Machado et al., 2020c). . Em relação à SOP, evidências científicas supõem uma associação bidirecional com a DP, revelando-se que a SOP aumenta 28% o risco de ter DP e que mulheres com SOP desenvolvem mais dificuldade em melhorar da inflamação provocada pela DP (Machado et al., 2020b). E as mulheres com VB, a DP foi relacionada a maior inflamação, caracterizada por contagem aumentada de leucócitos e linfócitos (Escalda et al., 2021).

Com base em dados epidemiológicos, de avaliação clínica e em modelos animais, a periodontite tem sido associada a várias patologias sistêmicas, conforme está indicado na figura 3. A periodontite induz a inflamação sistêmica, aguda, bacteremias, modificações metabólicas e resposta inflamatória nos hepatócitos e na MO, o que pode interferir com as condições inflamatórias sistêmicas já presentes no paciente. As bactérias periodontais podem atingir locais extraorais, através da disseminação por três vias, a

hematogénica, a orofaríngea ou a orodigestiva (colonizam ectopicamente o intestino), causando ou exacerbando doenças inflamatórias (Hajishengallis & Chavakis, 2021).

A periodontite sendo uma doença inflamatória polimicrobiana, afeta significativamente, outras patologias sistêmicas, contudo o seu tratamento manifestou efeitos favoráveis na diminuição da inflamação sistêmica e consequentemente nas doenças sistêmicas (Botelho et al., 2019; Hussain et al., 2020; Lin et al., 2021; Such et al., 2019).

Os conhecimentos sobre a etiopatogenia dessas comorbidades e a compreensão da associação entre a periodontite e elas, é relevante para o diagnóstico precoce e para a qualidade de vida do paciente, podendo fornecer uma melhoria na gestão da periodontite através do tratamento periodontal local, que atenua os marcadores inflamatórios sistêmicos. Como o conhecimento do mecanismo biológico entre a periodontite e as repercussões sistêmicas ainda não é totalmente conhecido e além disso, os estudos em humanos demonstra elevada variabilidade, é justificável o uso de modelos animais para compreender melhor esta pragmática (Albandar et al., 2018; Bascones-Martínez et al., 2015; Escalda et al., 2021; Hajishengallis & Chavakis, 2021).

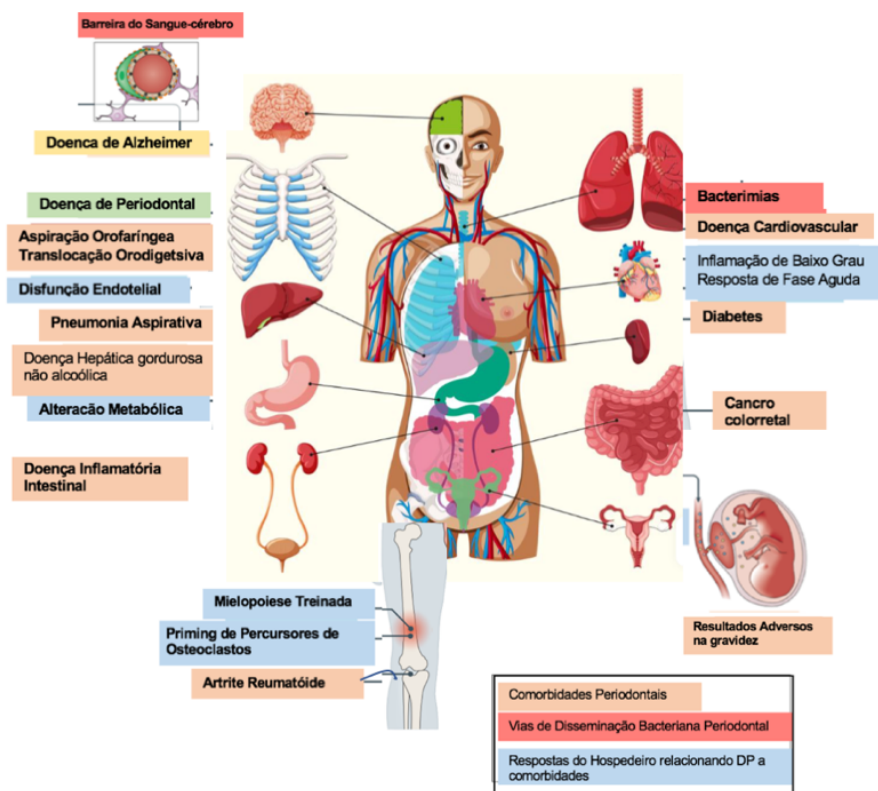


Figura 3- Relação da DP e doenças sistêmicas. Adaptado de Hajishengallis & Chavakis, 2021.

6. Métodos de indução de periodontite *in vitro* em ratos

Nas últimas décadas, diversos métodos experimentais têm sido descritos para induzir a periodontite em animais. Os modelos experimentais com ratos são boas ferramentas para investigar mecanismos de patogênese periodontal e testar novas abordagens terapêuticas (Abe & Hajishengallis, 2013; Rojas et al., 2021).

A utilização de experimentos em animais baseia-se em regras éticas, considerando o respeito de não intervir diretamente em humanos e permitindo desta forma, elucidar melhor os processos biológicos da periodontite e desenvolver/potencializar estratégias e terapias (Vargas-Sanchez et al., 2017). O procedimento experimental é a melhor correlação entre a hipótese e o tratamento clínico (Tomina et al., 2022). Todavia, a variabilidade dos modelos encontrados na literatura, dificulta comparações diretas entre os resultados e conclusões dos experimentos, sendo imprescindível uma análise comparativa da progressão da periodontite e suas implicações sistêmicas, utilizando distintas técnicas, com o objetivo de selecionar a mais adequada para futuros estudos (Mustafa et al., 2021).

Para selecionar o melhor modelo animal, é necessário ter em consideração que as características fisiológicas, anatômicas e orgânicas devem ser muito semelhantes. Desta forma, os camundongos e ratos são muito empregues em pesquisas biomédicas por apresentam parâmetros fisiológicos e imunológicos semelhantes à doença humana, baixo custo e fácil manuseio (Abe & Hajishengallis, 2013).

Para o estudo da periodontite é crucial que a anatomia dentária do animal utilizado seja muito similar com a do ser humano, ou seja, dentes que apresentem três partes distintas: coroa, colo e raiz. Os primeiros e segundos molares de roedores são semelhantes aos dos humanos, podendo estes serem usados em estudos para avaliar os parâmetros clínicos da periodontite (Pereira et al., 2019). E além disso, as características encontradas na estrutura tecidual, da área gengival e a degradação do osso/colagénio, durante a perda óssea alveolar, são muito semelhantes em ratos e humanos (Vargas-Sanchez et al., 2017). Contudo, segundo Gao et al. (2022), as estruturas dentárias, as CEJ (permitem medições de perda de inserção), a estrutura dos tecidos periodontais e a suscetibilidade do hospedeiro dos camundongos não são totalmente idênticas as dos humanos. Com a técnica da ligadura a colonização e adesão microbiana é induzida, no entanto, algumas bactérias orais humanas podem não colonizar a cavidade oral de camundongos, e além

disso a sua resistência bacteriana difere da dos humanos, sendo por esse motivo categórico interpretar os resultados e ponderar estas características, previamente ao planejamento em humanos (Gao et al., 2022).

Os protocolos induzidos por periodontite são um modelo de estudo atraente porque é fácil obter amostras de tecido microbiano e hospedeiro para investigar longitudinalmente a ligação entre os efeitos inflamatórios locais e sistêmicos da periodontite (Abe & Hajishengallis, 2013). O primeiro modelo animal usado para induzir a perda óssea alveolar foi realizado no *Forsyth Institute* nos Estados Unidos (Schanaider & Silva, 2004). A partir desse, vários protocolos têm sido usados para induzir a periodontite em modelo animal, como injeções com bactérias inativadas ou lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) (Klausen, 1991) e via ligadura retentiva (Rovin et al., 1966).

Os LPS pertencem à membrana externa de bactérias gram-negativas e sua aplicação no tecido gengival causa ataque químico e inflamação local. A injeção intragengival de LPS é geralmente aplicada na região do segundo molar e resulta em um processo inflamatório local, com destruição dos tecidos periodontais, incluindo perda óssea alveolar (Abe & Hajishengallis, 2013; Oz & Puleo, 2011). A principal limitação desta técnica é que a infecção periodontal é causada apenas por um patógeno, portanto o significado translacional desse procedimento pode ser limitado (Leira et al., 2020).

O método retentivo por ligadura em ratos para indução de periodontite foi descrito em 1966 e ainda é uma das técnicas mais utilizadas, baseado na colocação de um fio de sutura (algodão, seda ou nylon) ao redor da região cervical dos dentes molares (superiores ou inferiores). Este protocolo visa estimular a retenção de placa (Rovin et al., 1966). Este método mimetiza a periodontite humana, uma vez que disbiose microbiana é o principal fator de risco para o início e desenvolvimento da periodontite (Abe & Hajishengallis, 2013; De Souza et al., 2011; Gao et al., 2022; Mustafa et al., 2021).

Os marcadores inflamatórios IL-1 α , PCR, TNF- α , análises hematológicas e histológicas evidenciam uma inflamação periodontal semelhante e reproduzível, quando o modelo de periodontite induzida por ligadura é utilizado, demonstrando que este método é eficaz para propostas e tratamentos utilizados em ensaios pré-clínicos (De Souza et al., 2011; Gao et al., 2022; Mustafa et al., 2021; Tomina et al., 2022).

Atualmente, a periodontite induzida por ligadura em ratos é o principal modelo utilizado na pesquisa periodontal, neste modelo, a perda óssea alveolar (ABL) é o principal parâmetro avaliado por técnicas radiográficas, morfométricas e histológicas (Mustafa et al., 2021; Vargas-Sanchez et al., 2017). Curiosamente, embora essas metodologias sejam amplamente utilizadas, não está totalmente esclarecido nem a cinética da ABL ao longo do tempo de indução nem o grau de concordância (repetibilidade e reprodutibilidade) dessas técnicas (Vargas-Sanchez et al., 2017).

Segundo Fogacci *et al.* (2017), a periodontite induzida em ratos fêmeas Wistar demonstrou que a taxa de fertilidade foi reduzida significativamente no grupo com periodontite, todavia não é um fator de risco para parto prematuro ou baixo peso ao nascer. Uma vez que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos com periodontite e controle, em relação às citocinas mensuradas na placenta, líquido amniótico ou soro materno, exceto IL-6, que estava diminuído, o que sugere que as citocinas não podem ser facilmente transferidas por este tecido na direção materno-fetal. No entanto, pacientes com periodontite contêm citocinas pró-inflamatórias séricas mais elevadas, assim como TNF- α , IL-1 β e IL-6, em comparação com controles saudáveis, e por isso a periodontite está relacionada com muitas doenças sistêmicas e alterações adversas durante a gravidez (Hajishengallis & Chavakis, 2021; Suh et al., 2019).

A partir de uma análise de referências bibliográficas sobre o método para induzir periodontite em ratos, especialmente nos ratos fêmea Wistar, foi possível perceber que ainda existe uma carência em relação à sua eficácia, descrição completa e detalhada para que possa ser facilmente reprodutível. A avaliação dos efeitos colaterais da periodontite usando distintas técnicas pode ser vantajoso para comparar os resultados de pesquisas anteriores e selecionar a técnica mais apropriada para futuros estudos.

7. Objetivos

O objetivo do presente estudo experimental é comparar os efeitos locais e sistêmicos produzidos por diferentes modelos de indução de periodontite *in vitro* em ratos fêmea Wistar, nomeadamente, através de injeção gengival de LPS de *P. gingivalis* e com o método de ligadura, por meio de análises laboratoriais do soro e histopatológicas do periodonto, trompas, ovários e útero.

II. MATERIAS E MÉTODOS

1. Considerações éticas

O presente projeto encontra-se no âmbito do projeto “*Periodontal Health and Fertility in Rats*” (PETIT) financiado pelo Centro de Investigação Interdisciplinar Egas Moniz *Center of Interdisciplinary Research* (CiiEM) Investiga. 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 (DGAV) e Alimentar (anexo 1). Este projeto teve aprovação ética formal Comissão de Ética do Órgão Responsável pelo Bem-Estar Animal (ORBEA – anexo 2), sendo posteriormente ratificado pela comissão de Ética Egas Moniz (processo nº PT-72/22– anexo 3).

Os ratos fêmea Wistar sistemicamente saudáveis de 7 semanas de idade foram alojadas individualmente, em condições ambientais estáveis (temperatura de 23°C, humidade relativa de 40%, ciclo claro-escuro de 12 horas e livre acesso a comida e água).

2. Protocolo clínico de indução de periodontite

Os ratos fêmea foram distribuídos aleatoriamente em três grupos. Um grupo serviu de controlo e nos restantes a periodontite foi induzida através do método retentivo com ligadura e pelo método de injeção de LPS de *P. gingivalis*. A figura 4 esquematiza os grupos e o número de animais utilizados por grupo.

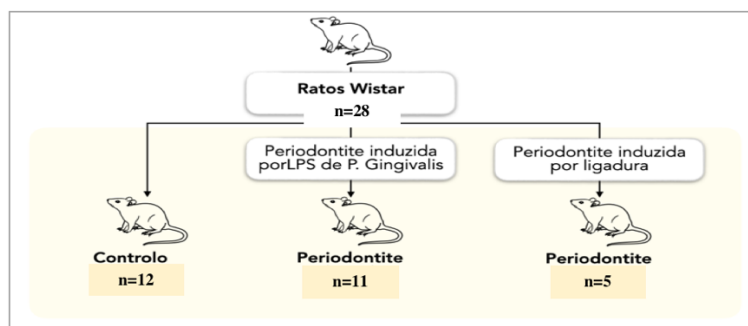


Figura 4- Proposta de uma metodologia para induzir periodontite em ratos fêmea Wistar pelas técnicas de ligadura e por injeção de LPS de *P. gingivalis*.

Previamente à indução, cada animal foi anestesiado na região intra-peritoneal com uma mistura de cetamina (100mg/gr) (Bio2-Rep) e xilazina (10mg/Kg) (Bio2-Rep), numa proporção de 2:1.

A colocação de ligadura foi realizada através da colocação de fio de sutura tamanho 5-0 de algodão ao redor do segundo molar maxilar bilateral. As ligaduras mantiveram-se no local durante 21 dias, e seguidamente os ratos foram sacrificados (de Molon et al., 2018).

Para a indução de LPS de *P. gingivalis*, foram preparadas alíquotas de 10 µL foram preparadas adicionando 1 mL de água homogeneizada livre de endotoxinas a 1 mg de LPS de *P. gingivalis*. A preparação obtida foi injetada na gengiva palatina entre os primeiros e segundos molares superiores em ambos os lados. Esta injeção foi repetida com intervalos de 48 horas, conforme recomendado por publicações anteriores (Kador et al., 2011), durante duas semanas (Elburki et al., 2014), num total 14 dias com um total de 6 injeções de LPS de *P. gingivalis* por lado. Após 14 dias, todos os ratos foram sacrificados por meio de deslocamento do pescoço após anestesia. As amostras de tecidos e sangue foram recolhidas para posterior análise.

3. Alterações histopatológicas do periodonto

Para observar a inflamação periodontal e a remodelação óssea, a maxila de cada animal foi recolhida, fixada em formol tamponada a 10% e codificada. Seguidamente, os

tecidos foram descalcificados e embebidos em parafina, seccionados, corados com hematoxilina e eosina e examinados no microscópio para detecção do grau de inflamação e necrose.

Para inflamação, os tecidos (trompas, ovários, útero e periodonto) foram avaliados e atribuídos a uma pontuação numérica com base no número de células inflamatórias (células polimorfonucleares e mononucleares) presentes por campo de 40x usando o seguinte sistema de pontuação: 1 (nenhuma) menos de 10 células inflamatórias; 2 (leve) 10-50 células inflamatórias; 3 (moderado) 51-100 células inflamatórias; e 4 (grave) mais de 100 células inflamatórias.

Para necrose, os tecidos foram avaliados em aumento de 10x e atribuídos uma pontuação numérica com base na extensão da camada de tecido que foi necrótica usando o seguinte sistema de pontuação: 1 (nenhum) 0-25%; 2 (leve) 25-50%; 3 (moderado) 50-75%; e 4 (grave) 75-100%. Todas as avaliações microscópicas foram feitas por um patologista experiente que desconheça o estado da amostra (tabela 1).

Tabela 1– Valores de referência para relacionar com o grau de inflamação e necrose.

Inflamação tecidual		Necrose tecidual	
Score (40x)	Classificação	Score (10x)	Classificação
1: <10 células inflamatórias*	Nenhuma	1: 0 a 25% tecido necrótico	Nenhuma
2: 10 a 50 células inflamatórias*	Leve	2: 26 a 50% tecido necrótico	Leve
3: 51 a 100 células inflamatórias*	Moderada	3: 51 a 75% tecido necrótico	Moderada
4: >100 células inflamatórias*	Grave	4: 76 a 100% tecido necrótico	Grave

* células polimorfonucleares e mononucleares.

4. Recolha de sangue e análises laboratoriais

A recolha de sangue foi realizada através de punção ventricular após a anestesia no dia da eutanásia. Foram recolhidos 4000 µL de sangue venoso utilizando uma agulha de calibre 22 com uma seringa de 5 mL. O sangue foi mantido durante 1 hora em temperatura ambiente, e seguidamente o soro foi separado através de centrifugação durante 7 minutos a 3000 g de rotação. O equipamento utilizado para avaliar os parâmetros clínicos foi o analisador hematológico automatizado Sysmex da série-XN-10 (Sysmex, 2012a, 2012b).

O equipamento Sysmex XN10 analisa as propriedades fisiológicas e químicas das células, com elevada precisão, especificidade e produtividade. Através da citometria de fluxo fluorescente, o sistema avalia, com base no tamanho, estrutura e informações relacionadas com o interior das células, as características fisiológicas e químicas celulares. A amostra é previamente diluída, células sanguíneas passam por uma célula de fluxo estreita, onde incide um raio laser (semicondutor), que as irá separar utilizando três sinais: dispersão frontal de luz (FSC), dispersão lateral de luz (SSC) e a luz de fluorescência lateral (SFL) (figura 5). Este analisador hematológico faz o uso de uma metodologia que engloba a lise celular específica e coloração fluorescente, que proporciona uma avaliação detalhada da morfologia celular (Sysmex, 2012a, 2012b). O equipamento é constituído por cinco novos canais:

- Canal de células leucocitárias nucleadas (WNR);
- Canal de determinação diferencial de células leucocitárias (WDF);
- Canal de plaqueta fluorescente (PLT-F);
- Canal de reticulócitos (RET);
- Canal de análise de líquidos biológicos.

O canal de WDF, através de citometria de fluxo fluorescente e da metodologia SAFLAS realiza a diferencial leucocitária e a contagem total de leucócitos, independentemente do valor da contagem de leucócitos ($< 0,50 \times 10^3$). Este dispositivo emprega uma inovadora metodologia para discriminar monócitos, linfócitos, linfócitos atípicos e blastos, utilizando a SSC, a SFL e a metodologia de SAFLAS. A metodologia SAFLAS consegue discriminar um conjunto de células permitindo detetar linfócitos, monócitos e células anormais (figura 6). A SSC disponibiliza informações sobre a complexidade celular, a SFL fornece informação quantitativa sobre os ácidos desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA) (figura 7). Fazendo o uso dos reagentes Lysercell® WDF e Fluorocell® WDF, os parâmetros reportáveis são: NEUT%, NEUT#, LINFO%, LINFO#, MONO%, MONO#, EO%, EO# IG%, IG# (Sysmex, 2012a, 2012b)

O canal de RET a partir da FSC e SFL analisa a nível qualitativo e quantitativo a eritropoiese, obtendo-se a produção de reticulócitos e de ferro na hemoglobina. Este canal permite ainda avaliar a quantidade de plaquetas pelo método ótico. Utiliza os reagentes CELLPACK® DFL, Fluorocell® RET para avaliar os parâmetros RET#, RET%, IRF (Fração Imatura dos Reticulócitos) e RET-He (Conteúdo de Hemoglobina nos Reticulócitos) (Sysmex, 2012a, 2012b).

Com a citometria de fluxo fluorescente foi possível identificar a diferencial leucocitária, a imunoglobulina G (IgG), os eritroblastos (NRBC), reticulócitos (RET), Fração Imatura dos Reticulócitos (IRF), Plaqueta Fluorescente (PLT-F) e Fração Imatura de Plaqueta (IPF). Com a impedância e foco hidrodinâmico foi avaliado o PLT-I (plaquetas), eritrócitos (RBC) e hematócrito (HCT). Pelo método de Sulfato Lauril de Sódio, livre de cianeto determinou-se a hemoglobina (HGB) (Sysmex, 2012a, 2012b).

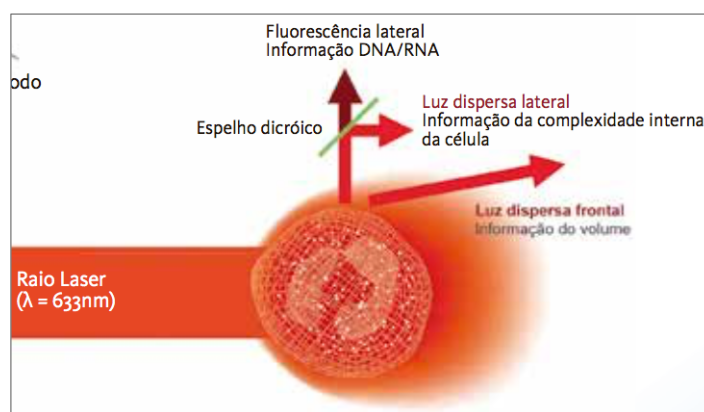


Figura 5- Analisador hematológico da Série-XN com tecnologia avançada, utiliza três sinais: dispersão frontal de luz (FSC), dispersão lateral de luz (SSC) e a luz de fluorescência lateral (SFL) (Sysmex, 2012a).



Figura 6- Metodologia SAFLAS: analisa em detalhes as populações de linfócitos e monócitos (Sysmex, 2012a).

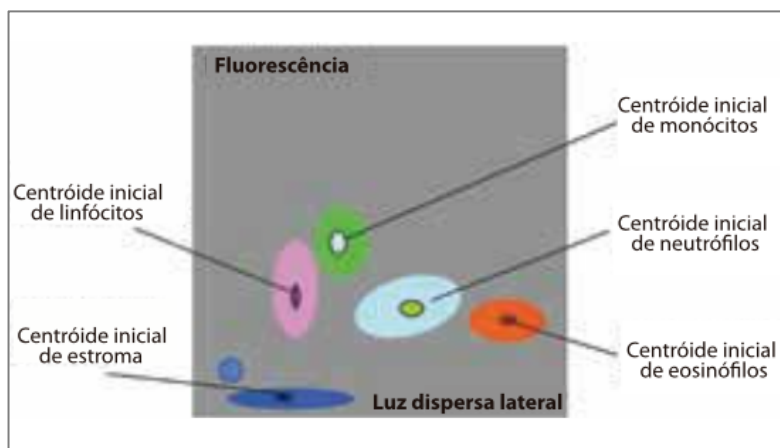


Figura 7- A imagem ilustra mostra como populações diferentes de células, particularmente monócitos e linfócitos, podem ser separadas usando a análise da densidade populacional e dispersão lateral de luz vs. fluorescência (Sysmex, 2012a).

5. Análise estatística

A média e desvio padrão foram calculados para variáveis contínuas e posteriormente o método de Shapiro-Wilk foi aplicado para confirmar a distribuição normal da amostra. Nas hipóteses de comparação de dois grupos recorreu-se ao teste *t* de *Student* e nas que foram comparados mais de dois grupos empregou-se o teste *Kruskal-Wallis*. Os propósitos destes testes, especificamente, o de normalidade de distribuição e o de homogeneidade de variância foram analisados com o teste de Shapiro-Wilk e o de Levene, respetivamente (Barros & Reis, 2003; Thomas & Nelson, 2002).

Os dados paramétricos foram testados quanto ao efeito do tratamento usando uma análise de variância de duas vias (ANOVA). Para realizar a análise estatística com a ANOVA (teste paramétrico) é preciso validar o seguinte pressuposto, que a normalidade e variância sejam constantes. Quando não for possível validar esse pressuposto, devemos utilizar o Teste de *Kruskal-Wallis*. O teste de *Kruskal-Wallis* (não paramétrico) exige um número mínimo de cinco variáveis e de três grupos, para indicar se existe diferença entre pelo menos dois grupos. Este teste permite testar a hipótese de que várias amostras têm a mesma distribuição. Para utilizar este método estatístico, os valores numéricos devem ser modificados em postos e agrupados apenas num só conjunto de dados, sendo posteriormente, a comparação dos grupos, efetuada através da média dos postos (posto médio) (Barros & Reis, 2003; Thomas & Nelson, 2002)

Todas as análises foram realizadas com software de programa estatístico R para Mac e todos os testes foram realizados a um nível de significância de 0.05.

III. RESULTADOS

1. Análises laboratoriais

Os ratos fêmea Wistar (n=28) foram distribuídos em três grupos, um grupo de controlo, um grupo com periodontite induzida por ligadura e outro grupo com periodontite induzida por injeção de LPS de *P. gingivalis*. Os parâmetros laboratoriais após a indução da periodontite pelos dois métodos e no grupo controlo estão demonstrados na tabela 2.

O grupo de controlo foi significativamente diferente do grupo com periodontite induzida por ligadura, para os valores clínicos de leucócitos ($5,22 \pm 2,24$ $p=0.0099$), neutrófilos ($34,67 \pm 14,91$ $p=0.0153$), linfócitos ($63,07 \pm 14,90$ $p=0.0190$), creatinina ($739,25 \pm 217,28$ $p= 0.0023$), LDH ($1507,67 \pm 367,95$ $p= 0.0092$), lípase ($4,25 \pm 0,97$ $p=0.0065$), proteínas totais ($5,33 \pm 0,44$ $p= 0.0278$), TASO ($15,16 \pm 10,7$ $p=0.0459$) e IgG ($23,32 \pm 35,47$ $p= 0.0001$). E o grupo com periodontite induzida por ligadura também apresentou diferença significativa do grupo com periodontite induzida por injeção de LPS, para os mesmos parâmetros clínicos, anteriormente citados.

O grupo com periodontite induzida por injeção de LPS não diferiu estatisticamente do grupo de controlo em nenhum dado laboratorial, à exceção do valor de ureia, que obteve discreta diferença significativa ($p=0.0004$), com valor de $38,81 \pm 5,57$ e no grupo de controlo $48,01 \pm 3,91$. Não ocorreu diferença significativa nos parâmetros hormonais sexuais em nenhuma das amostras submetidas aos métodos.

Globalmente, o grupo com periodontite induzida por ligadura, apresentou maior contagem de linfócitos ($82,62 \pm 4,39$ $p= 0,0190$) e IgG ($93,32 \pm 20,7$ $p= 0,0001$), em relação ao grupo de controlo e também quando comparado com o grupo com periodontite induzida por injeção de LPS. E nos parâmetros de leucócitos ($2,18 \pm 0,52$ $p= 0,0099$), e neutrófilos ($15,76 \pm 4,68$ $p=0,0153$) obteve-se uma diminuição dos valores nos ratos fêmea Wistar com periodontite induzida por ligadura, quando comparado com o grupo de controlo e igualmente quando comparado com o grupo com periodontite induzida por injeção de LPS (gráfico 1).

Tabela 2- Valores obtidos dos parâmetros laboratoriais para as amostras submetidas à indução de periodontite, pelos métodos de indução com ligadura por 21 dias e com injeção de LPS de *P. gingivalis* durante 14 dias, e na amostra controle.

Parâmetros Clínicos	Teste Levene	Indução de periodontite por LPS	Indução de periodontite por Ligaduras	Controlo	p-value			Teste
		Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Grupo Controlo vs Grupo Ligaduras	Grupo Controlo vs Grupo LPS	Grupo Ligaduras vs Grupo LPS	
Leucócitos (10 ⁹ /L)	0.01728	4,69 ± 1,35 ^a	2,18 ± 0,52 ^b	5,22 ± 2,24 ^a	0.0099	0.6231	0.0177	KW
Eritrócitos (10 ¹² /L)	0.7259	6,64 ± 0,80 ^a	7,36 ± 0,33 ^a	7,04 ± 0,38 ^a	0.5699	0.2497	0.0732	ANOVA
Hemoglobina (g/dL)	0.7658	13,14 ± 1,47 ^a	13,40 ± 0,48 ^a	13,70 ± 0,76 ^a	0.8610	0.4317	0.8926	ANOVA
Hematócrito (%)	0.9323	49,74 ± 5,29 ^a	48,24 ± 2,96 ^a	51,10 ± 4,25 ^a	0.4727	0.7537	0.8150	ANOVA
Plaquetas (10 ⁹ /L)	0.1008	793,18 ± 180,74 ^a	627,60 ± 131,19 ^a	714,67 ± 257,22 ^a	0.7235	0.6531	0.3324	ANOVA
Neutrófilos (%)	0.01341	37,39 ± 4,25 ^a	15,76 ± 4,68 ^b	34,67 ± 14,91 ^a	0.0153	0.8478	0.0218	KW
Linfócitos (%)	0.04539	59,71 ± 5,98 ^a	82,62 ± 4,39 ^b	63,07 ± 14,90 ^a	0.0190	0.6929	0.0170	KW
Monócitos (%)	0.3199	2,59 ± 2,92 ^a	1,28 ± 0,33 ^a	1,96 ± 1,46 ^a	0.8162	0.7511	0.4857	ANOVA
Eosinófilos (%)	0.8081	0,22 ± 0,20 ^a	0,20 ± 0,31 ^a	0,27 ± 0,22 ^a	0.8502	0.8696	0.9882	ANOVA
Basófilos (%)	0.5311	0,09 ± 0,16 ^a	0,14 ± 0,31 ^a	0,04 ± 0,08 ^a	0.5253	0.7658	0.8525	ANOVA
Estradiol (ng/L)	0.3592	12,91 ± 4,30 ^a	14,58 ± 13,29 ^a	12,58 ± 10,07 ^a	0.9083	0.9958	0.9364	ANOVA
Progesterona	0.4209	5,87 ± 0,00 ^a	9,84 ± 3,01 ^a	11,48 ± 9,51 ^a	0.8880	0.1268	0.5178	ANOVA
Cortisol	0.5035	2,00 ± 0,97 ^a	2,30 ± 0,70 ^a	2,07 ± 1,01 ^a	0.8895	0.9865	0.8334	ANOVA
Proteína C-Reativa	0.2655	0,01 ± 0,01 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,01 ± 0,01 ^a	0.2471	0.6442	0.0715	ANOVA
Albumina	0.5257	3,94 ± 0,28 ^a	4,32 ± 0,22 ^a	4,13 ± 0,31 ^a	0.4384	0.2649	0.0527	ANOVA
Fosfatase Alcalina	0.1342	121,45 ± 15,95 ^a	108,20 ± 25,33 ^a	118,67 ± 44,07 ^a	0.8191	0.9771	0.7334	ANOVA
Alanina Transaminase (U/L)	0.3774	24,00 ± 3,41 ^a	35,80 ± 6,26 ^a	41,75 ± 60,87 ^a	0.8191	0.9771	0.7334	ANOVA
Amilase	0.3911	1714,18 ± 148,81 ^a	1683,41 ± 258,01 ^a	1677,92 ± 157,04 ^a	0.9779	0.8726	0.9809	ANOVA
Amilase P	0.4459	1487,91 ± 123,17 ^a	1440,60 ± 156,71 ^a	1457,42 ± 138,93 ^a	0.9750	0.8742	0.8242	ANOVA
AST	0.2953	97,73 ± 19,03 ^a	150,20 ± 42,70 ^a	127,33 ± 62,56 ^a	0.6301	0.2959	0.1115	ANOVA
Cálcio	0.5775	2,64 ± 0,23 ^a	2,85 ± 0,21 ^a	2,59 ± 0,15 ^a	0.0525	0.8396	0.1336	ANOVA

Parâmetros Clínicos	Teste Levene	Indução de periodontite por LPS	Indução de periodontite por Ligaduras	Controlo	p-value			Teste
		Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Grupo Controlo vs Grupo Ligaduras	Grupo Controlo vs Grupo LPS	Grupo Ligaduras vs Grupo LPS	
Creatinina Quinase (mg/dL)	0.08828	701,00 ± 181,25 ^a	1336,60 ± 576,06 ^b	739,25 ± 217,28 ^a	0.0023	0.9483	0.0014	ANOVA
Ferro (µg/dL)	0.3481	313,91 ± 95,29 ^a	419,00 ± 45,74 ^a	381,5 ± 106,47 ^a	0.7397	0.2209	0.1191	ANOVA
LDH (U/L)	0.8761	1395,91 ± 255,1 ^a	964,80 ± 293,20 ^b	1507,67 ± 367,95 ^a	0.0092	0.6764	0.0454	ANOVA
Lipase	0.0273	3,81 ± 0,65 ^a	6,32 ± 0,15 ^b	4,25 ± 0,97 ^a	0.0065	0.3470	0.0012	KW
Proteínas Totais (g/dL)	0.4028	5,15 ± 0,22 ^a	5,49 ± 0,55 ^b	5,33 ± 0,44 ^a	0.0278	0.5236	0.0040	ANOVA
Ureia (mg/dL)	0.7670	38,81 ± 5,57 ^a	42,34 ± 4,37 ^{a,b}	48,01 ± 3,91 ^b	0.1122	0.0004	0.3435	ANOVA
TASO	0.1247	20,15 ± 10,22 ^a	2,63 ± 3,36 ^b	15,16 ± 10,7 ^a	0.0459	0.4446	0.0054	ANOVA
IgA	0.1557	0,71 ± 0,64 ^a	1,46 ± 0,30 ^a	1,22 ± 0,91 ^a	0.8109	0.2450	0.1635	ANOVA
IgM	0.07323	6,28 ± 1,21 ^a	6,70 ± 3,29 ^a	5,08 ± 1,50 ^a	0.2365	0.2735	0.9051	ANOVA
IgG	0.3105	7,03 ± 2,7 ^a	93,32 ± 20,7 ^b	23,32 ± 15,17 ^a	0.0001	0.2808	0.0000	ANOVA

AST: Aspartato Aminotransferase (biomarcador hepático); **LDH:** Lipoproteína de baixa densidade (transporta colesterol do fígado para as artérias); **TASO:** Título de Antiestreptolisina O (identifica a presença da toxina estreptolisina O produzida pela bactéria *Streptococcus pyogenes*; **IgA, IgM, IgG:** imunoglobulinas A, M e G.

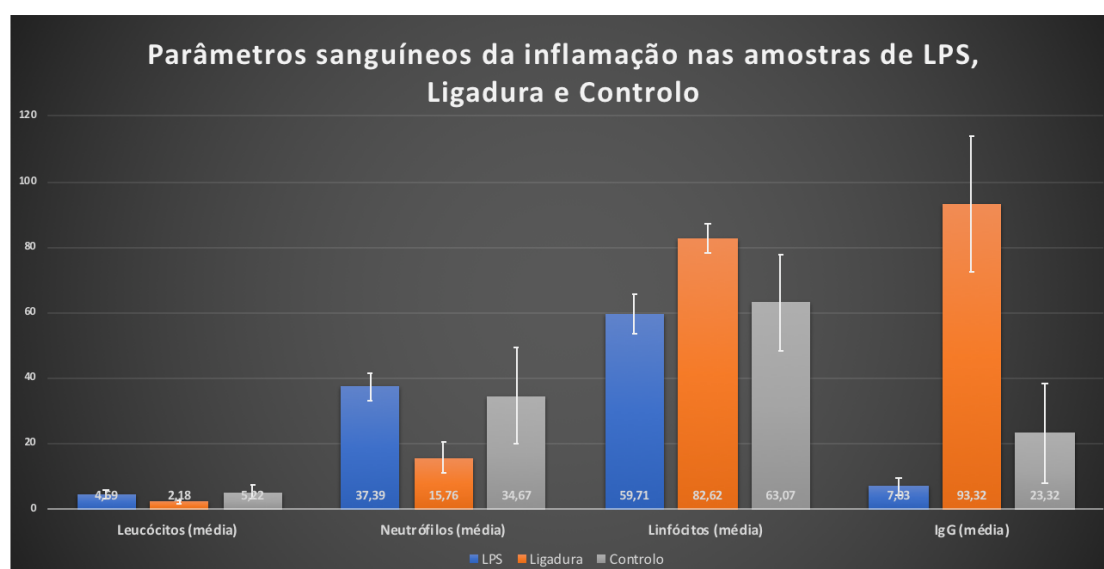


Gráfico 1 - Parâmetros sanguíneos de inflamação avaliados para cada um dos três grupos de análise (grupo com periodontite induzida com LPS, grupo com periodontite induzida com ligadura e grupo controlo).

2. Alterações histopatológicas do periodonto, trompas, ovários e útero

Para mensurar as alterações histopatológicas locais a nível periodontal e sistêmicas (nas trompas, ovários e útero) foi avaliado o grau de inflamação e necrose dos tecidos, sendo atribuídos uma pontuação numérica com base no número de células inflamatórias para a inflamação e com base na extensão da camada de tecido necrótico, conforme foi anteriormente descrito por de Molon et al. (2018) e está detalhado na tabela 2.

No grupo com periodontite induzida por injeção de LPS, dos 11 ratos fêmea Wistar, 4 obtiveram inflamação leve no periodonto, dos quais 3 tiveram entre 10 a 20 com predomínio de PMNs (neutrófilos polimorfonucleares), e 1 teve entre 20 a 30 com predomínio de PMNs. Estes mesmos 4 ratos fêmea Wistar, não obtiveram nenhuma inflamação nos órgãos trompas, ovários e útero e também não adquiriram necrose tecidual, conforme está representado na tabela 3 e no gráfico 2.

Dos 11 ratos fêmea Wistar submetidos a periodontite induzida por injeção de LPS, 3 tiveram inflamação leve apenas no útero, com predomínio de eosinófilos entre 20 a 30 células (para 2 amostras) e com predomínio de eosinófilos e linfócitos entre 40 a 50 células (para 1 amostra). Estes 3 ratos fêmea Wistar, não obtiveram nenhuma inflamação nos órgãos trompas, ovários e periodonto e também não desenvolveram necrose tecidual, de acordo com os dados demonstrados na tabela 3 e no gráfico 2.

No grupo com periodontite induzida por ligadura, dos 5 ratos fêmea Wistar, 4 apresentaram inflamação grave no periodonto, com mais de 100 células inflamatórias presentes por campo de 40x, e desses 4 ratos, 2 adquiriram inflamação moderada no útero (com mais de 84 células, com predomínio de eosinófilos) e 2 desenvolveram inflamação leve no útero (entre 30 a 40 células com predomínio de eosinófilos). O rato fêmea Wistar que teve inflamação leve no periodonto (24 células com predomínio de neutrófilos), obteve inflamação grave no útero (60 células com predomínio de eosinófilos). Dos 5 ratos fêmea Wistar submetidos a periodontite induzida por ligadura, nenhum adquiriu inflamação nas trompas ou ovários, e do mesmo modo, não desenvolveram necrose tecidual, segundo é evidenciado na tabela 3 e no gráfico 2.

No grupo controle, dos 12 ratos fêmea Wistar, no útero, 5 não desenvolveram inflamação, 6 apresentaram inflamação leve (com células inflamatórias entre 10 a 50), e

1 teve inflamação moderada com 56 células de eosinófilos. Neste grupo, 9 ratos não obtiveram inflamação no periodonto, 1 teve inflamação leve (entre 10 a 20 com predomínio de PMNs) e 2 adquiriram inflamação moderada (76 células, com predomínio de neutrófilos). Na amostra de controlo nenhum rato desenvolveu inflamação nas trompas ou ovários, assim como, nenhum apresentou necrose tecidual (tabela 3 e gráfico 2).

Tabela 3- Parâmetros histopatológicos da inflamação e/ou necrose no periodonto, trompas, ovários e útero, obtidos nas amostras submetidas à indução de periodontite, pelos métodos de indução com ligadura por 21 dias e com injeção de LPS de *P. gingivalis* durante 14 dias, e na amostra controlo.

		INFLAMAÇÃO				NECROSE
Grupo	Teste Levene	Trompas	Ovários	Útero	Periodonto (gengiva)	
LPS	0101	1	1	1	1	1
LPS	0102	1	1	1	2 (entre 20 e 30 com predomínio de PMNs)	1
LPS	0103	1	1	2 (entre 20 e 30 com predomínio de eosinófilos)	1	1
LPS	0104	1	1	2 (entre 40 e 50 com predomínio de eosinófilos e linfócitos)	1	1
LPS	0105	1	1	1	2 (entre 10 e 20 com predomínio de PMNs)	1
LPS	0106	1	1	1	1	1
LPS	0107	1	1	1	1	1
LPS	0108	1	1	1	2 (entre 10 e 20 com predomínio de PMNs)	1
LPS	0109	1	1	2 (entre 20 e 30 com predomínio de eosinófilos)	1	1
LPS	0110	1	1	1	1	1
LPS	0111	1	1	1	2 (entre 10 e 20 com predomínio de PMNs)	1
Ligadura	0101	1	1	3 (60, com predomínio de eosinófilos)	2 (24, com predomínio de nts) (*)	1
Ligadura	0102	1	1	2 (36, com predomínio de eosinófilos)	4	1
Ligadura	0103	1	1	3 (91, com predomínio de eosinófilos)	4	1
Ligadura	0104	1	1	2 (entre 30 e 40, com predomínio de eosinófilos)	4	1
Ligadura	0105	1	1	3 (cerca de 84, com predomínio de eosinófilos)	4	1

		INFLAMAÇÃO				NECROSE
Grupo	Teste Levene	Trompas	Ovários	Útero	Periodonto (gengiva)	
Controlo	0201	1	1	2 (entre 20 e 30 com predomínio de eosinófilos)	1	1
Controlo	0202	1	1	1	1	1
Controlo	0203	1	1	1	1	1
Controlo	0204	1	1	2 (entre 20 e 30 com predomínio de eosinófilos)	1	1
Controlo	0205	1	1	2 (entre 10 e 20 com predomínio de eosinófilos)	1	1
Controlo	0206	1	1	2 (entre 40 e 50 com predomínio de eosinófilos)	1	1
Controlo	0207	1	1	1	1	1
Controlo	0208	1	1	1	2 (entre 10 e 20 com predomínio de PMNs)	1
Controlo	0209	1	1	2 (entre 10 e 20 com predomínio de eosinófilos e linfócitos)	1	1
Controlo	0210	1	1	1	1	1
Controlo	0201	1	1	2 (entre 30 e 40, com predomínio de eosinófilos)	3 (76, com predomínio de nts)	1
Controlo	0202	1	1	3 (56, com predomínio de eosinófilos)	3 (76, com predomínio de nts) (*)	1

* PMNs (neutrófilos polimorfonucleares), *Nts (neutrófilos).

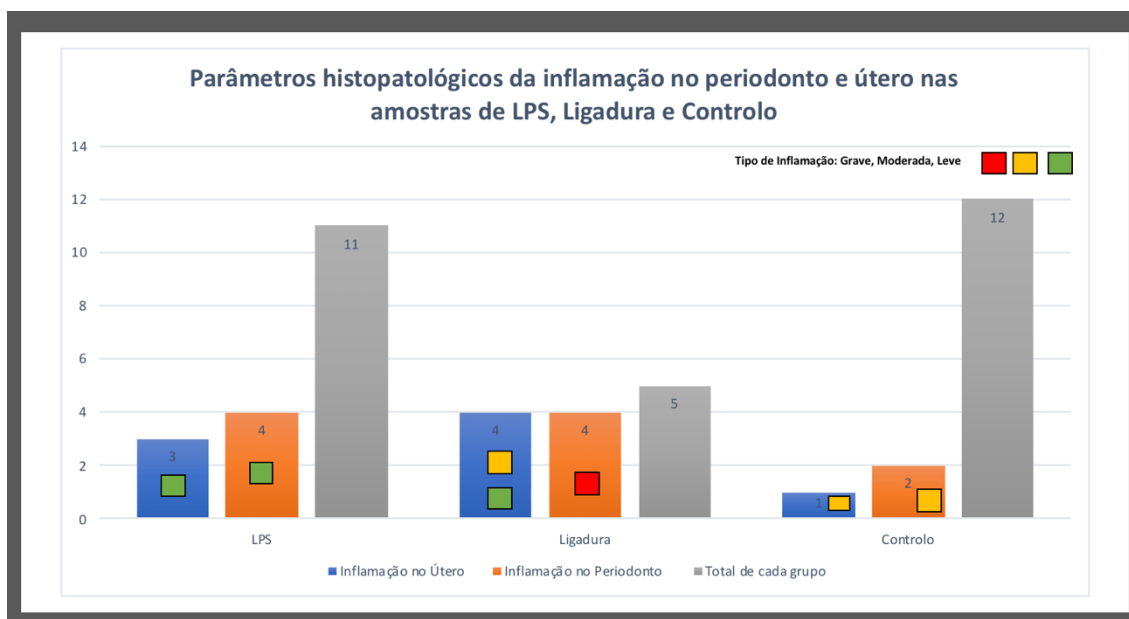


Gráfico 2 - Parâmetros histopatológicos do tipo e quantidade de inflamação encontrada no periodonto e útero, para cada um dos três grupos de análise (grupo com periodontite induzida com LPS, grupo com periodontite induzida com ligadura e grupo controlo).

IV. DISCUSSÃO

Este estudo *in vitro* corrobora com a associação da periodontite com alterações locais e doenças sistêmicas, sendo que o processo inflamatório no periodonto e órgãos reprodutores femininos foi avaliado por análise histológica e os níveis séricos de hemograma, hormonas sexuais e parâmetros inflamatório foram medidos através de análise sanguínea. A análise laboratorial quantitativa deste experimento revelou que o grupo com periodontite induzida por ligadura foi significativamente diferente, do grupo de controlo, e do grupo com injeção de LPS de *P. gingivalis*. E que a amostra de rato fêmea Wistar, submetida a periodontite induzida por ligadura, apresentou contagens mais altas de linfócitos, IgG e lipoproteína de baixa densidade (LDH) e valores inferiores de leucócitos e neutrófilos, quando comparado com os grupos controlo e com o de injeção de LPS. A inflamação no útero, identificada no grupo com a técnica de ligadura, mostra uma possível relação com alterações no útero de ratos fêmea Wistar com periodontite crónica. No presente estudo, o grupo com periodontite induzida por ligadura, devido à inflamação grave desenvolvida no periodonto, mostra que o método pode induzir a destruição periodontal generalizada, severa e crónica, tendo desta forma, a periodontite o potencial de desenvolver patologias inflamatórias sistêmicas.

A presente pesquisa experimental é consistente com a associação da periodontite com resposta imune inflamatória (provocando alterações periodontais) e ainda patologias sistêmicas (cardiovasculares, neurológicas, metabólicas, entre outras), sendo semelhante a outros estudos da literatura que aferiram a relação entre essa resposta na periodontite e alterações sistêmicas (Botelho et al., 2020; Botelho et al., 2021; Lin et al., 2021).

Os dados obtidos no nosso experimento, pela análise sanguínea são idênticos a outras pesquisas, sendo que obteve-se alterações nos parâmetros de linfócitos, IgG, leucócitos, neutrófilos e LDH, no grupo com periodontite induzida por ligadura, quando comparado com os grupos sem periodontite (controlo) ou com periodontite induzida por injeção de LPS de *P. gingivalis* (Botelho et al., 2020; Hajishengallis & Chavakis, 2021; Jepsen et al., 2020; Lin et al., 2021).

Estudos têm proposto uma associação da dislipidemia, condição que provoca modificações nos valores de lipídios no sangue, com a potencial de degradação periodontal (Bitencourt et al., 2023). Segundo Nepomuceno et al. (2017), pacientes com

periodontite crônica expressaram níveis significativamente mais altos de colesterol total, triglicerídeos e LDH, quando comparados com indivíduos sem periodontite. No estudo apresentado obteve-se também alteração nos níveis lipídicos, com aumento de LDH no grupo com periodontite induzida por ligadura.

A síndrome metabólica é definida como um conjunto de patologias, incluindo a dislipidemia, obesidade, hipertensão e disglícemia, e evidências científicas sustentam a relação bidirecional da síndrome metabólica e a periodontite, reforçando que a presença de ambas no mesmo paciente, pode impactar negativamente as duas condições sistêmicas (Jepsen et al., 2020). A síndrome metabólica consiste em um espectro de condições metabólicas que aumentam o risco de desenvolver DM e doença cardiovascular, contribuindo para a morbidade global e mortalidade (Bitencourt et al., 2023; Jepsen et al., 2020).

Segundo Machado et al. (2020a), pacientes com níveis elevados de inflamação gengival e BP profundas, podem ter maior risco de desenvolver hipertensão arterial. Como a periodontite pode estar associada ao aumento do PA, abordagens de tratamento periodontal que conduzam ao controle da PA e beneficiem os pacientes ao nível da saúde cardiovascular, proporcionam menor morbidade e mortalidade (Muñoz Aguilera et al., 2020; Sanz et al., 2019).

Para melhor caracterizar a patologia, realizamos análises microscópicas, sendo que a histopatológica revelou inflamação grave no periodonto, apenas no grupo com periodontite induzida por ligadura, em 4 dos 5 ratos fêmea Wistar, e no útero adquiriu-se, com este método, inflamação moderada em 2 ratos e inflamação leve em outros 2 ratos.

Estudos experimentais realizados por Collins et al., (1994) em animais comprovam a hipótese de relação entre a periodontite e o parto prematuro (quando o bebê nasce antes das 37 semanas), sendo a infecção materna o fator que representa maior impacto (50%) para o parto prematuro (Collins et al., 1994a, 1994b). As infecções genitais maternas conduzem a resposta inflamatória, que levam à contração do músculo liso, resultando no amadurecimento cervical prematuro. Além da infecção, a bacteremia

presente na periodontite durante a gestação pode afetar o útero expondo o bebê a MOs e a toxinas que conduzirão ao parto prematuro (Hegde & Awan, 2019). A periodontite sendo uma patologia inflamatória crônica é considerada igualmente como um potencial fator de risco para a fertilidade feminina, devido à disseminação sistêmica de patógenos, citocinas e imunoglobulinas inflamatórias (Peres et al., 2019). Os mecanismos inflamatórios e hormonais podem interferir na função reprodutora feminina, nomeadamente na maturação folicular, ovulação, implantação embrionária e gravidez. Sendo ainda, a periodontite relacionada com a endometriose, vaginose bacteriana e síndrome dos ovários policísticos (Machado, et al., 2020b, 2020c).

A inflamação do tipo moderada e leve encontradas no útero, na amostra que foi submetida ao método de retenção da ligadura, evidencia uma possível relação de alteração no útero em ratos fêmea Wistar com periodontite crônica.

Segundo Pereira et al. (2019) a análise histopatológica demonstrou que no grupo de ligadura o infiltrado inflamatório era intenso e composto principalmente por linfócitos e neutrófilos em quase todos os casos, enquanto que, no grupo de controlo o infiltrado inflamatório era discreto e composto por plasmócitos e alguns linfócitos, o que é comum inclusive na gengiva saudável devido a traumatismo dentário. Assim como noutros experimentos, não foram detectadas diferenças significativas entre o grupo de LPS e o de controlo, nas análises clínicas realizadas e os resultados histopatológicos revelaram alterações destrutivas significativas nos tecidos periodontais após a técnica de ligadura (Mustafa et al., 2021; Pereira et al., 2019).

As ligaduras mantiveram-se no local durante 21 dias e na última década, um novo modelo de periodontite usando ratos tem sido amplamente empregue para simular a destruição do tecido periodontal e a reabsorção do osso alveolar (Abe & Hajishengallis, 2013; De Souza et al., 2011; Gao et al., 2022; Mustafa et al., 2021). O período de permanência da ligadura pode variar de acordo com a finalidade, ou seja, de 0-14 dias, o modelo de DP induzido por ligadura, resulta em reabsorção óssea alveolar rápida, aguda, com presença de biomarcadores inflamatórios elevados, e de 14-21 dias, o modelo reproduz uma periodontite crônica, sem progressão da perda óssea e sem inflamação exacerbada (de Molon et al., 2018; Leira et al., 2019; Mustafa et al., 2021).

A causa fundamental de destruição do tecido periodontal durante a periodontite é a resposta imune inadequada ou excessiva. O modelo de periodontite induzida por ligadura em camundongos, quando comparado com o modelo experimental de infecção por *P. gingivalis*, pode repercutir a imunidade inata e adquirida contra infecções bacterianas, evidenciando a inflamação da periodontite e sendo mais eficaz para investigar os mecanismos moleculares da patologia (Lin et al., 2021).

Experimentos clínicos evidenciam que os PMNs (neutrófilos polimorfonucleares) são responsáveis pela lesão periodontal inicial ou inflamação aguda, estando correlacionados com a imunidade inata e sendo ativados pelas quimiocinas para reequilibrar os efeitos da inflamação, sendo no entanto, o seu recrutamento fundamental para a homeostase do tecido periodontal. Os PMNs desenvolvem-se na medula óssea, estão relacionados com a patogénese da DP e representam cerca de 30% do número total de leucócitos circulantes, em corpos murinos (Abe & Hajishengallis, 2013; Botelho et al., 2021; Gao et al., 2022). A destruição periodontal generalizada está associada com a diminuição quantitativa de PMNs, enquanto que as deficiências qualitativas são mais correlacionadas com a periodontite localizada. A neutropenia e defeitos na quimiotaxia e fagocitose por PMNs, de acordo com Nussbaum & Shapira (2011), podem aumentar a gravidade da lesão periodontal e como os PMNs também induzem a produção de toxinas como a collagenase ou citoninas pró-inflamatórias, podem ainda contribuir para a destruição óssea.

Na periodontite, durante a imunidade inata e adquirida distintas linhagens de células estão envolvidas, nomeadamente, em resposta à lesão periodontal, na imunidade inata, os neutrófilos e fagócitos mononucleares participam ativamente nesta fase, enquanto que, numa fase mais avançada da patologia, a resposta imune torna-se adaptativa e os linfócitos B e plasmócitos evidenciam-se nos tecidos gengivais. Os linfócitos T e B atuam na resposta imunológica da DP, sendo que as células T regulam a DP e as B produzem os anticorpos. Ambos os linfócitos estão em elevadas concentrações na periodontite crónica (Botelho et al, 2021; Van Dyke, 2007).

As imunoglobulinas (Ig) presentes na saliva (IgA, IgG e IgM) são fatores de proteção do periodonto e influenciam na microbiota oral, permitindo a aderência bacteriana ou bloqueando o metabolismo celular do patógeno. Evidências clínicas, demonstram que a IgA (imunoglobulina mais abundante na saliva) aumenta em pacientes com periodontite, quando comparados com indivíduos com periodonto saudável. E além disso, as Ig diminuem significativamente após a terapia periodontal (Ebersole, 2003; Ebersole et al., 2001; Seemann et al., 2004).

Como noutras doenças infecciosas, a imunidade humoral no periodonto mediada por IgA, IgM e IgG é inicialmente protetora, todavia, as respostas humorais podem causar danos no tecido periodontal, através da ligação à toxina bacteriana para neutralização, dos anticorpos com atividade indireta como internalização mediada por opsonização ou por ativação da via clássica do sistema complemento (Ebersole, 2003; Ebersole et al., 2001; Seemann et al., 2004).

Segundo a revisão científica, a concentração sérica de IgG deve-se à presença de bactérias periodontais, especificamente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* e o seu aumento está associado à gravidade da periodontite (Ebersole et al., 2001).

Desta forma, a diminuição de leucócitos e neutrófilos, e o aumento de linfócitos e IgG, obtidos no presente estudo, no grupo com periodontite induzida por ligadura, quando comparado com os grupos sem periodontite (controlo) ou com periodontite induzida por injeção de LPS de *P. gingivalis*, revela que o método pode provocar destruição periodontal generalizada, grave e crónica, compatível com as alterações clínicas da periodontite humana. Esses resultados são ainda condizentes com a possibilidade, de que a periodontite pode ter um impacto potencial nas doenças inflamatórias sistémicas.

Com base em dados epidemiológicos, de avaliação clínica e em modelos animais, a periodontite tem sido associada a várias patologias sistémicas. A periodontite induz a inflamação sistémica, aguda, bacterimias e modificações metabólicas, o que pode interferir com as condições inflamatórias sistémicas já presentes no paciente. As bactérias periodontais podem atingir locais extraorais, através da disseminação por três vias, a hematogénica, a orofaríngea ou a orodigestiva (colonizam ectopicamente o intestino), causando ou exacerbando doenças inflamatórias (Hajishengallis & Chavakis, 2021).

Apesar da associação entre alterações na atividade eritropoiética e no mecanismo de diferenciação de algumas células na medula óssea, com a inflamação sistêmica resultante da periodontite, não serem totalmente esclarecidas, indivíduos com distúrbios de leucócitos aparentam ser mais predispostos à periodontite, por causa da fisiopatologia da doença e da função imune dos leucócitos (Botelho et al., 2021).

A periodontite sendo uma doença inflamatória polimicrobiana, afeta significativamente, outras patologias sistêmicas, contudo o seu tratamento manifestou efeitos favoráveis na diminuição da inflamação sistêmica e consequentemente nas doenças sistêmicas (Botelho et al., 2019; Hussain et al., 2020; Lin et al., 2021; Such et al., 2019). Por esse motivo, os conhecimentos sobre a etiopatogenia dessas comorbidades e a compreensão da associação entre a periodontite e elas, é relevante para o diagnóstico precoce e para a qualidade de vida do paciente, podendo fornecer uma melhoria na gestão da periodontite através do tratamento periodontal local, que atenua os marcadores inflamatórios sistêmicos.

Os protocolos de periodontite induzida em modelo animal são atrativos porque são reprodutíveis e fáceis de obter amostras sanguíneas e histopatológicas do tecido periodontal e de órgãos reprodutores femininos, para investigar longitudinalmente a ligação entre os efeitos inflamatórios locais e sistêmicos da periodontite, possibilitando novas abordagens terapêuticas, após a escolha do melhor método (Mustafa et al., 2021)

No entanto, a técnica com injeção intragengival de LPS, que resulta em um processo inflamatório local, com destruição dos tecidos periodontais, apresenta a limitação que a infecção periodontal é causada apenas por um patógeno, portanto o significado translacional desse procedimento pode ser limitado (Abe & Hajishengallis, 2013; Leira et al., 2020; Oz & Puleo, 2011). Já o método de ligadura, visa estimular a retenção de placa e mimetiza a periodontite humana, uma vez que disbiose microbiana é o principal fator de risco para o início e desenvolvimento da periodontite (Abe & Hajishengallis, 2013; De Souza et al., 2011; Gao et al., 2022; Mustafa et al., 2021).

Contudo, o modelo de periodontite induzida por ligadura também não será capaz de reproduzir todas as características biológicas e histológicas da periodontite em humanos, todavia, os modelos animais necessitam ser explorados experimentalmente, antes da aplicação de novas terapias em humanos. Apesar deste estudo ter um número reduzido de amostra e de não ter sido realizado o acompanhamento após remoção da

ligadura, torna-se indispensável a aplicação de um método preciso, reprodutível e com sinais clínicos semelhantes às observações clínicas encontradas nos humanos com periodontite, para que haja uma metodologia a ser empregue e melhore o conhecimento sobre a etiopatogenia da DP.

V. CONCLUSÃO

O grupo com periodontite induzida por ligadura, mostra que o método induziu maior destruição periodontal comparativamente com o protocolo de indução com LPS e teve um potencial impacto nas doenças inflamatórias sistêmicas, tanto a nível sanguíneo como a nível histológico inflamatório. Pela análise laboratorial quantitativa deste experimento, o grupo com periodontite induzida por ligadura foi significativamente diferente, do grupo de controlo, e do grupo com injeção de LPS de *P. gingivalis*, apresentando contagens mais altas de linfócitos, IgG e LDH e valores inferiores de leucócitos e neutrófilos, quando comparado com os outros grupos. A inflamação no útero, identificada no grupo com a técnica de ligadura, mostra uma possível relação com alterações no útero de ratos fêmea Wistar com periodontite crónica. Os resultados obtidos também são consistentes com a possibilidade de que a periodontite possa ter um impacto potencial nas doenças inflamatórias sistêmicas.

Futuramente, estudos com amostras mais amplas e com maior tempo de permanência das ligaduras são necessários, para avaliar as alterações provocadas nos efeitos locais e sistêmicos, incluindo nos órgãos femininos.

VI. BIBLIOGRAFIA

- 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(October 2017), S171–S189. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12947>
- Albandar, J., & Rams, T. (2002). Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontology 2000*, 29(4018), 7–10.
- Barros, M. V. G., & Reis, R. . (2003). *Análise de dados em atividade física e saúde* (Londrina:).
- Bascones-Martínez, A., Muñoz-Corcuera, M., & Bascones-Ilundain, J. (2015). Diabetes and periodontitis: A bidirectional relationship. *Medicina Clinica*, 145(1), 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2014.07.019>
- Bitencourt, F. V., Nascimento, G. G., Costa, S. A., Orrico, S. R. P., Ribeiro, C. C. C., & Leite, F. R. M. (2023). The Role of Dyslipidemia in Periodontitis. *Nutrients*, 15(2), 1–11. <https://doi.org/10.3390/nu15020300>
- Borgo, P. V., Rodrigues, V. A. A., Feitosa, A. C. R., Correa, K., Xavier, B., & Avila-campos, M. J. (2014). Association between periodontal condition and subgingival microbiota in women during pregnancy : a longitudinal study. *J Appl Oral Sci.*, 22(6), 528–533.
- Botelho, J., Machado, V., Hussain, S. B., Zehra, S. A., Proença, L., Orlandi, M., Mendes, J. J., & D’Aiuto, F. (2020). Periodontitis and circulating blood cell profiles: a systematic review and meta-analysis. *Experimental Hematology*, 93, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2020.10.001>
- 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., & 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), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52116-6>

- Bourgeois, D., Bouchard, P., & Mattout, C. (2007). Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002-2003. *Journal of Periodontal Research*, 42(3), 219–227. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2006.00936.x>
- Bui, F. Q., Almeida-da-Silva, C. L. C., Huynh, B., Trinh, A., Liu, J., Woodward, J., Asadi, H., & Ojcius, D. M. (2019). Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomedical Journal*, 42(1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.12.001>
- Carvalho, R., Botelho, J., Machado, V., Mascarenhas, P., Alcoforado, G., Mendes, J. J., & Chambrone, L. (2021). Predictors of tooth loss during long-term periodontal maintenance: An updated systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 48(8), 1019–1036. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13488>
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M., & Tonetti, M. S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Periodontology*, 89(S1), S1–S8. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0157>
- 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>
- Collins, J. G., Smith, M. A., Arnold, R. R., & Offenbacher R., S. (1994). Effects of Escherichia coli and Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide on Pregnancy Outcome in the Golden Hamster. *Infection and Immunity*, 62(10), 4652–4655.
- Collins, J. G., Windley, H. W., Arnold, R. R., & Offenbacher, S. (1994). Effects of a Porphyromonas gingivalis infection on inflammatory mediator response and pregnancy outcome in hamsters. *Infection and Immunity*, 62(10), 4356–4361. <https://doi.org/10.1128/iai.62.10.4356-4361.1994>
- Costa, L. L., Gomes, G., Araújo, P. H. De, Gennedyr, J., Lima, C., França, G. M. De, & Pinheiro, J. C. (2020). O papel do sistema imunológico na patogênese da doença periodontal. 1–6.
- Curtis, M. A., Diaz, P. I., & Van Dyke, T. E. (2020). The role of the microbiota in periodontal disease. *Periodontology* 2000, 83(1), 14–25. <https://doi.org/10.1111/prd.12296>
- D’Aiuto, F., Parkar, M., Nibali, L., Suvan, J., Lessem, J., & Tonetti, M. S. (2006). Periodontal infections cause changes in traditional and novel cardiovascular risk factors: Results from a randomized controlled clinical trial. *American Heart Journal*, 151(5), 977–984. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2005.06.018>
- 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., 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>
- Ebersole, J. L. (2003). Humoral immune responses in gingival crevice fluid: Local and systemic implications. *Periodontology 2000*, 31(Table 2), 135–166. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2003.03109.x>
- Ebersole, J. L., Cappelli, D., & Holt, S. C. (2001). Periodontal diseases: To protect or not to protect is the question? *Acta Odontologica Scandinavica*, 59(3), 161–166. <https://doi.org/10.1080/000163501750266756>
- 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>
- Escalda, C. (2021). *Associação de vaginose bacteriana com periodontite em uma pesquisa nacional americana transversa*. 1–9.
- 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), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79496-4>
- Fogacci, M. F., Cardoso, E. de O. C., Barbirato, D. da S., de Carvalho, D. P., & Sansone, C. (2017). No association between periodontitis and preterm low birth weight: a case-control study. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 297(1), 71–76. <https://doi.org/10.1007/s00404-017-4556-9>
- Fogacci, M. F., Da Silva Barbirato, D., Da Silva Furtado Amaral, C., Da Silva, P. G., De Oliveira Coelho, M., 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>
- GBD 2017 Oral Disorders Collaborators et. (2020). Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. *Journal of Dental Research*, 99(4), 362–373. <https://doi.org/10.1177/0022034520908533>
- 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., & 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>
- Hegde, R., & Awan, K. H. (2019). Effects of periodontal disease on systemic health. *Disease-a-Month : DM*, 65(6), 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2018.09.011>
- Holde, G. E., Baker, S. R., & Jönsson, B. ncbi. nlm. nih. gov/pmc/articles/PMC7088322/pdf/10.1177_0022034520908533. pd. (2018). Periodontitis and quality of life: What is the role of socioeconomic status, sense of coherence, dental service use and oral health practices? An exploratory theory-guided analysis on a Norwegian population. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(7), 768–779. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12906>
- Holde, G. E., Oscarson, N., Trovik, T. A., Tillberg, A., & Jönsson, B. (2017). Periodontitis Prevalence and Severity in Adults: A Cross-Sectional Study in Norwegian Circumpolar Communities. *Journal of Periodontology*, 88(10), 1012–1022. <https://doi.org/10.1902/jop.2017.170164>
- Holtfreter, B., Schwahn, C., Biffar, R., & Kocher, T. (2009). Epidemiology of periodontal diseases in the study of health in Pomerania. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(2), 114–123. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01361.x>
- Jepsen, S., Suvan, J., & Deschner, J. (2020). The association of periodontal diseases with metabolic syndrome and obesity. *Periodontology 2000*, 83(1), 125–153. <https://doi.org/10.1111/prd.12326>
- Klausen Bjarne. (1991). Periodontal Disease in Rats. *J Periodontol*.
- 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>
- Kurt, S., Gürkan, Ç. G., Keleş Tezal, G. Ç., Çiftçi, A., Gürgör, P. N., Güler, Ş., & Çetinkaya, B. Ö. (2019). Histopathological and biochemical evaluation of the effect of Paeoniflorin on the periodontium during and after periodontitis formation in rats. *Archives of Oral Biology*, 102(October 2018), 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.04.006>
- Lang, N. P., & Bartold, P. M. (2018). Periodontal health. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(May 2017), S9–S16. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12936>
- Leira, Y., Iglesias-Rey, R., Gómez-Lado, N., Aguiar, P., Campos, F., D’Aiuto, F., Castillo, J., Blanco, J., & Sobrino, T. (2019). Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced periodontitis and serum amyloid-beta peptides. *Archives of Oral Biology*, 99(January), 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.01.008>
- 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>

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). <https://doi.org/10.3390/ijms22168900>

Machado, V., Aguilera, E. M., Botelho, J., Hussain, S. B., Leira, Y., Proença, L., D’aiuto, F., & Mendes, J. J. (2020). Association between periodontitis and high blood pressure: Results from the study of periodontal health in almada-seixal (sophias). *Journal of Clinical Medicine*, 9(5), 1–13. <https://doi.org/10.3390/jcm9051585>

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(July), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.706432>

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), 1–16. <https://doi.org/10.3390/jcm9061961>

Machado, V., Lopes, J., Patrão, M., Botelho, J., Proença, L., & Mendes, J. J. (2020). Infertility Conditions : a Concise Review. *Reproduction*, 10(1), R41–R54.

Mark Bartold, P., & Van Dyke, T. E. (2013). Periodontitis: A host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontology 2000*, 62(1), 203–217. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00450.x>

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>

Murakami, S., Mealey, B. L., Mariotti, A., & Chapple, I. L. C. (2018). Dental plaque–induced gingival conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(February 2017), S17–S27. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12937>

Mustafa, H., Cheng, C. H., Radzi, R., Fong, L. S., Mustapha, N. M., & Dyary, H. O. (2021). Induction of periodontal disease via retentive ligature, lipopolysaccharide injection, and their combination in a rat model. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 24(3), 365–373. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2021.138727>

Nepomuceno, R., Pigossi, S., & Finoti, LS. (2017). Serum lipid levels in patients with periodontal disease: a meta-analysis and meta-regression. *J Clin Periodontol*, 44(12), 1192–1207.

Nussbaum, G., & Shapira, L. (2011). How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? *Journal of Clinical Periodontology*,

38(SUPPL. 11), 49–59. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01678.x>

Otenio, C. C. M., Fonseca, I., Martins, M. F., Ribeiro, L. C., & Assis, N. M. S. P. (2012). Pregnant Women With Periodontal Disease. *Genetics and Molecular Research*, 11(4), 4468–4478. <https://www.funpecrp.com.br/gmr/year2012/vol11-4/pdf/gmr2082.pdf>

Oz, H. S., & Puleo, D. A. (2011). Animal models for periodontal disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/754857>

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., Benzan, 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)

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>

Rovin, S., Costich, E. R., & Gordon, H. A. (1966). <The influence of bacteria and irritation.pdf>. *J. Periodontol*, 1, 193–203.

Sanz, M., Marco del Castillo, A., Jepsen, S., Gonzalez-Juanatey, J. R., D’Aiuto, F., Bouchard, P., Chapple, I., Dietrich, T., Gotsman, I., Graziani, F., Herrera, D., Loos, B., Madianos, P., Michel, J. B., Perel, P., Pieske, B., Shapira, L., Shechter, M., Tonetti, M., ... Wimmer, G. (2019). Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(3), 268–288. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13189>

Schanaider, A., & Silva, P. (2004). Sediment drifts of the northeast Atlantic and their relationship to the observed abyssal currents. *Bulletin - Institut de Geologie Du Bassin d’Aquitaine*, 31–32(1947), 141–149. [https://doi.org/10.1016/0198-0254\(83\)90109-7](https://doi.org/10.1016/0198-0254(83)90109-7)

Schroeder, H. E., & Listgarten, M. A. (1997). The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontology* 2000, 13(1), 91–120. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00097.x>

Seemann, R., Hägewald, S. J., Sztankay, V., Drews, J., Bizhang, M., & Kage, A. (2004). Levels of parotid and submandibular/sublingual salivary immunoglobulin A in response to experimental gingivitis in humans. *Clinical Oral Investigations*, 8(4), 233–237. <https://doi.org/10.1007/s00784-004-0280-5>

Simões, J., Figueiredo Augusto, G., do Céu, A., Ferreira, M. C., Jordão, M., Calado, R., & Fronteira, I. (2018). Ten years since the 2008 introduction of dental vouchers in the Portuguese NHS. *Health Policy*, 122(8), 803–807. <https://doi.org/10.1016/j.healthpol.2018.07.013>

- 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). <https://doi.org/10.1038/s41368-019-0054-1>
- Sysmex. (2012a). *Novo Design Novas Possibilidades*. <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XN-Português.pdf>
- Sysmex. (2012b). *Tecnologia e Parâmetros Clínicos Avançados*. <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XNTecnologia-Português.pdf>
- Thomas, J. R., & Nelson, J. . (2002). *Métodos de pesquisa em atividade física*. (Porto Aleg).
- Tomina, D. C., Petruțiu, Ștefan A., Dinu, C. M., Crișan, B., Cighi, V. S., & Rațiu, I. A. (2022). Comparative Testing of Two Ligature-Induced Periodontitis Models in Rats: A Clinical, Histological and Biochemical Study. *Biology*, 11(5), 1–13. <https://doi.org/10.3390/biology11050634>
- Tonetti, M. S., Eickholz, P., Loos, B. G., Papapanou, P., Van Der Velden, U., Armitage, G., Bouchard, P., Deinzer, R., Dietrich, T., Hughes, F., Kocher, T., Lang, N. P., Lopez, R., Needleman, I., Newton, T., Nibali, L., Pretzl, B., Ramseier, C., Sanz-Sanchez, I., ... Suvan, J. E. (2015). Principles in prevention of periodontal diseases: Consensus report of group 1 of the 11th European Workshop on Periodontology on effective prevention of periodontal and peri-implant diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(S16), S5–S11. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12368>
- 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(January), S149–S161. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12945>
- Trombelli, L., Farina, R., Silva, C. O., & Tatakis, D. N. (2018). Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *Journal of Periodontology*, 89(1), S46–S73. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0576>
- Van Dyke, T. E. (2007). Cellular and molecular susceptibility determinants for periodontitis. *Periodontology 2000*, 45(1), 10–13. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2007.00228.x>
- Van Dyke, T. E., & Sheilesh, D. (2006). Risk factors for periodontitis. *International Journal of Dental Hygiene*, 4(1), 2–7. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5037.2006.00168.x>
- Vargas-Sanchez, P. K., Moro, M. G., dos Santos, F. A., Anbinder, A. L., Kreich, E., Moraes, R. M., Padilha, L., Kusiak, C., Scomparin, D. X., & Franco, G. C. N. (2017). Agreement, correlation, and kinetics of the alveolar bone-loss measurement methodologies in a ligature-induced periodontitis animal model. *Journal of Applied Oral Science*, 25(5), 490–497. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0517>
- WHO. (2016). Recomendações da OMS sobre cuidados pré-natais para uma experiência positiva na gravidez. *Organização Mundial Da Saúde*, 1, 1–10.

<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250800/WHO-RHR-16.12-por.pdf;jsessionid=DC4E449D7D2B65270A0CF5206707F720?sequence=2>

WHO. (2022). Global oral health status report. In *Dental Abstracts* (Vol. 57, Issue 2).

Zhang, B., Yang, Y., Yi, J., Zhao, Z., & Ye, R. (2021). Hyperglycemia modulates M1/M2 macrophage polarization via reactive oxygen species overproduction in ligature-induced periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 56(5), 991–1005. <https://doi.org/10.1111/jre.12912>

ANEXOS

Anexo 1



ATRIBUIÇÃO DE PERMISSÃO ADMINISTRATIVA DE FUNCIONAMENTO PROVISÓRIA

Ao abrigo do ponto 1, do artigo 31º do Decreto-Lei nº 113/2013, de 7 de Agosto, é outorgada permissão administrativa de funcionamento provisória ao estabelecimento de criação (para utilização interna) e de utilização de animais, o Biotério de pequenos roedores, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Lisboa, 22 de Julho de 2019

 O Diretor Geral

Fernando Bernardo



Graça Mariano
Subdiretora-Geral

Por despacho de delegação de competências nº 8140/2018
publicado no DRE, II série nº 159, de agosto de 2018



ORBEA ÓRGÃO RESPONSÁVEL PELO BEM-ESTAR ANIMAL

Parecer

Foi submetido ao ORBEA da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa um pedido de parecer, para a realização de um protocolo de investigação envolvendo experimental animal, acompanhado do formulário da DGAV para pedido de autorização de projeto de utilização de animais para fins científicos.

O protocolo de experimentação animal insere-se no âmbito do projeto **"Periodontal health and fertility in rats"** sendo o investigador responsável o Prof. Doutor João Pedro Fidalgo Rocha.

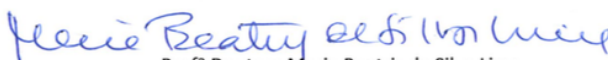
O protocolo de experimentação animal será realizado no Biotério do Campus do Lumiar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, sob a responsabilidade de investigadores creditados.

No âmbito do presente protocolo experimental foram avaliados em particular os seguintes parâmetros:

- Instrução do pedido
- Cumprimento dos 3Rs
- Benefício / Risco
- Categorias de severidade do(s) procedimento(s)
- Nº de animais e duração do protocolo

De acordo com os parâmetros avaliados e em conformidade com a legislação em vigor, o ORBEA emite parecer favorável relativamente à realização do presente protocolo de investigação.

Presidente do ORBEA, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa


Profª Doutora Maria Beatriz da Silva Lima

Anexo 3

