



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

LARISSA DOS SANTOS PESSOA

**AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO E SEVERIDADE DOS DANOS
HEPÁTICOS CAUSADOS PELA PERIODONTITE EXPERIMENTAL**

PARNAÍBA – PI
2017

LARISSA DOS SANTOS PESSOA

**AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO E SEVERIDADE DOS DANOS
HEPÁTICOS CAUSADOS PELA PERIODONTITE EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Medicina investigativa e marcadores epidemiológicos.

Orientador: Professor Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos

LARISSA DOS SANTOS PESSOA

**AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO E SEVERIDADE DOS DANOS
HEPÁTICOS CAUSADOS PELA PERIODONTITE EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

APROVADA EM ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos
Universidade Federal do Piauí

Profa. Dra. Karina Oliveira Drumond
Universidade Federal do Piauí

Profa. Dra. Joyce Pinho Bezerra
Universidade Estadual do Piauí

Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos
Universidade Federal do Piauí
(Orientador)

PARNAÍBA – PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba

Serviço de Processamento Técnico

P475a Pessoa, Larissa dos Santos.

Avaliação da extensão e severidade dos danos hepáticos causados pela periodontite experimental [manuscrito] / Larissa dos Santos Pessoa. – 2017.

80 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos.

1. Fígado Gorduroso. 2. Inflamação. 3. Doença Periodontal. 4. Medicina Oral. I. Título.

CDD: 616

*“A pedra preciosa não pode ser polida sem fricção, nem o homem aperfeiçoado sem
provações”*

Provérbio Chinês

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, depois à minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Meu sincero obrigado:

À minha família, pelo carinho, amor e suporte durante todos os momentos de aflições. Em especial meu pai José Maria Sousa Pessoa, minha mãe Lúcia de Fátima dos Santos Pessoa e minhas irmãs Layane dos Santos Pessoa e Liliane dos Santos Pessoa.

Ao meu namorado Zimefeld Gomes Pessoa por todo apoio e companheirismo nos momentos de angústia, tristeza e inseguranças.

À família Costa, que foram e são minha segunda família no Piauí. Em especial dona Irene Araújo da Costa, Hélio Pereira da Costa e minha amada e querida amiga Eveny Araújo da Costa por todo carinho nos momentos de convivência em sua casa, meu eterno obrigado.

À minha primeira orientadora Profa. Dra. Karina Oliveira Drumond, por ter sido a primeira professora a me dar a oportunidade de fazer pesquisa e por todos os momentos de ensinamentos, incentivos e pelo carinho durante todo o tempo, da graduação até hoje.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos, por ter me acolhido e dado suporte durante toda a mudança de pesquisa. Sou grata por toda a ajuda e ensinamentos.

À equipe do laboratório de Análise e Processamento Histológico (LAPHIS), Felipe Rodolfo Pereira da Silva, David Di Lenardo, Luiz Felipe de Carvalho França, Joaquina dos Santos Carvalho, Even Herlany Pereira Alves, André dos Santos Carvalho, Victor Brito Dantas Martins, Luana Silva Rodrigues, Luísa Lima Barreto do Nascimento, Raissa Silva Bacelar de Andrade, Ayane Araújo Rodrigues, Bruno Almeida Arrais Landim e Juliana Gomes Galeno, pela maravilhosa acolhida e amizade.

Aos meus amigos Felipe Rodolfo Pereira da Silva, Eveny Araújo da Costa, Bruna da Silva Souza, Fabiana Andreína da Silva Sátiro, Rafael Cunha da Silva, Breno Gonçalves Pinheiro, Emanuella Lima Teixeira Barros, Eliane Resende, Diego Pereira de Menezes, Kelly Maria Rêgo da Silva, que me deram toda ajuda necessária para que eu chegasse até aqui, foram amigos e irmãos. O amor e carinho recebidos foram imprescindíveis para me manter forte em vários momentos de dificuldade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI), pela bolsa de estudos que contribuiu com a concretização deste trabalho.

À Universidade Federal do Piauí e seus professores, por todo suporte dado durante a graduação e mestrado. Ao Curso de Pós Graduação em Ciências Biomédicas em especial ao coordenador Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto por todo apoio e por sanar todas as dúvidas referentes ao programa, sempre ajudando da melhor forma possível.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Imagem ilustrativa do tecido periodontal normal17
- Figura 2.** Imagem ilustrativa das diferenças entre gengivite e periodontite21
- Figura 3.** Imagem ilustrativa da associação da periodontite com o desenvolvimento da esteatose.....33

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Análise clínica dos grupos controle (**A** e **D**), uma ligadura (**B** e **E**) e duas ligaduras (**C** e **F**). Índice de sangramento gengival (**G**). Medida de profundidade de sondagem (**H**). Análise macroscópica da perda óssea alveolar das hemimandíbulas dos grupos controle (**I**), uma ligadura (**J**) e duas ligaduras. Mobilidade Dentária (**L**). Perda óssea alveolar total (**M**)61
- Figura 2.** Avaliação da Atividade de mieloperoxidase (**A**) e dos níveis de malondialdeído (**B**) no tecido gengival62
- Figura 3.** Análise histológica do fígado dos grupos controle (**A** e **D**), uma ligadura e duas ligaduras (**B** e **E**) e duas ligaduras (**C** e **F**)63
- Figura 4.** Avaliação da esteatose (**A**), da inflamação (**B**), da densidade de mastócitos (**C**), da necrose (**D**) e da atividade de mieloperoxidase (**E**) no tecido hepático.....64
- Figura 5.** Avaliação dos níveis de glutathiona (**A**), de malondialdeído (**B**), de colesterol total (**C**) e triglicerídeos (**D**) no tecido hepático65

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Peso corporal, peso do fígado e dosagens bioquímicas do soro	66
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TNF – Fator de necrose tumoral

IL – Interleucina

LPS – Lipopolissacarídeos

AST – Aspatato aminotransferase

ALT – Alanina aminotransferase

RANKL – Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa beta

ERO – Espécies reativas de oxigênio

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

MDA – Malondialdeído

GSH – Glutathiona

QR – Quilomicrons remanescentes

APO – Apoproteína

VLDL– Lipoproteína de densidade muito baixa.

HDL – Lipoproteína de alta densidade

IDL – Lipoproteína de densidade intermediária

LDL– Lipoproteína de baixa densidade

AGL– Ácido graxo livre

AGP– Ácido graxo poliinsaturado

MPO – Mieloperoxidase

GLUT-4 – Transportador de glicose

DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica

RI – Resistência à insulina

EH – Esteatose Hepática

IPS – Índice de profundidade de sondagem

GMP – Margem gengival e papila gengival

POA – Perda óssea alveolar

DMC – Densidade de mastócitos

PAS – Ácido periódico de Shiff

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	14
2 CAPÍTULO I	17
2.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1.1 Anatomia do periodonto	17
2.1.1.1 Gengiva.....	18
2.1.1.2 Ligamento Periodontal	18
2.1.1.3 Cimento radicular	18
2.1.1.4 Osso alveolar	19
2.1.2 Doença Periodontal.....	20
2.1.2.1 Gengivite	20
2.1.2.2 Periodontite.....	20
2.1.2.2.1 Periodontite e a microbiota oral.....	22
2.1.2.2.2 Periodontite e a indução da resposta inflamatória	23
2.1.3 Características gerais do fígado.....	25
2.1.4 Doença hepática	28
2.1.4.1 Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)	28
2.1.4.2 Esteatose não-alcoólica (ENA)	29
2.1.4.2.1 Associação entre esteatose e a periodontite	31
2.1.5 Indução da periodontite com ligadura	35
2.2 OBJETIVOS	36
2.2.1 Objetivo geral	36
2.2.2 Objetivos específicos	36
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.3.1 Tipo de estudo e aspectos éticos da pesquisa.....	37
2.3.2 Animais	37
2.3.3 Delineamento experimental.....	37
2.3.4 Parâmetros clínicos.....	37
2.3.4.1 Índice de sangramento gengival (ISG)	38

2.3.4.2 Índice de profundidade de sondagem (IPS).....	38
2.3.4.3 Mobilidade dentária.....	38
2.3.5 Medição da perda óssea alveolar (POA).....	38
2.3.6 Avaliação histopatológica do fígado.....	39
2.3.7 Dosagens.....	39
2.3.7.1 Atividade de Mieloperoxidase (MPO).....	39
2.3.7.2 Níveis de Glutathione (GSH).....	40
2.3.7.3 Níveis de Malondialdeído (MDA).....	40
2.3.7.4 Níveis de colesterol e triglicerídeos no tecido hepático.....	41
2.3.7.5 Dosagens bioquímicas do soro.....	41
2.3.8 Análise estatística.....	41
3 CAPÍTULO II.....	43
3.1 ARTIGO.....	43
4 CAPÍTULO III.....	67
4.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
4.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
ANEXO A – Carta de aprovação do comitê de ética.....	78
ANEXO B – Carta de aceite da revista.....	80

RESUMO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica desencadeada por uma infecção bacteriana, que acomete os tecidos periodontais e pode resultar em alterações sistêmicas, sendo o fígado um dos principais órgãos acometidos. Existem vários fatores que podem estar associados com a dispersão da periodontite para outros sítios, tais como a migração das bactérias e seus produtos (lipopolissacarídeos), a resposta exacerbada do sistema imunológico (polimorfonucleares e citocinas) e o estresse oxidativo (peroxidação de lipídeos). No fígado esses fatores podem resultar em uma lesão conhecida como esteatose, caracterizada pelo acúmulo de lipídeos no interior dos hepatócitos. Este estudo teve como objetivo avaliar a extensão e severidade dos danos hepáticos relacionados ao aumento no número de sítios periodontais afetados. Foram utilizadas 18 ratas divididas em três grupos de seis animais: controle, sem ligadura; periodontite 1, com uma ligadura; periodontite 2, com duas ligaduras. As ratas foram submetidas à análise dos seguintes parâmetros periodontais: índice de sangramento gengival, índice de profundidade de sondagem, mobilidade dentária e medição da perda óssea alveolar. Nas amostras gengivais foram realizadas as dosagens da atividade de mieloperoxidase (MPO) e de malondialdeído (MDA). No tecido hepático foram dosados os níveis de MDA, glutathiona (GSH), colesterol total, triglicérides e a atividade de MPO. As amostras de fígado também foram sujeitas à avaliação histopatológica. Por fim, foram dosados os níveis séricos de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase. Os resultados dos parâmetros da avaliação periodontal demonstraram que o modelo de periodontite foi eficaz. Os grupos com periodontite não diferiram significativamente em relação à atividade de MPO e aos níveis de MDA nas amostras de tecido gengival, mas apresentaram valores significativos quando comparados ao grupo controle. O grupo com duas ligaduras apresentou o maior valor de peso corporal em quando comparado aos demais grupos. A comparação entre três grupos em relação ao peso do fígado não demonstrou diferenças significativas. A avaliação histopatológica dos grupos com periodontite demonstrou a presença de esteatose, diferentemente do observado no controle. Na análise dos escores de esteatose os grupos com ligadura não diferiram significantemente entre si, contudo apresentaram resultados significantes na comparação com o grupo controle. Os parâmetros de inflamação, necrose e densidade de mastócitos foram observados nos três grupos, entretanto não foi evidenciado diferenças significativas entre eles. A análise da atividade de MPO nas amostras de tecido hepático não apresentou alterações significativas entre grupos do estudo. Os níveis de GSH, MDA, colesterol total e triglicérides nos grupos com periodontite não demonstraram diferenças significativas, no entanto quando comparados com o grupo controle os dados apresentaram-se significativos. Em conclusão, nossos resultados demonstraram que a esteatose induzida pela periodontite não apresenta extensão e severidade associadas ao aumento do número de sítios periodontais afetados.

Palavras-chave: fígado gorduroso, inflamação, doença periodontal, medicina oral

ABSTRACT

Periodontitis is a chronic inflammatory disease triggered by a bacterial infection that affects the periodontal tissues and can result in systemic alterations, with the liver being one of the main organs affected. There are several factors that may be associated with the dispersion of periodontitis to other sites, such as the migration of bacteria and their products (lipopolysaccharides), the exacerbated immune system response (polymorphonuclear and cytokine) and oxidative stress (lipid peroxidation). In the liver these factors can result in an injury known as steatosis, characterized by the accumulation of lipids within the hepatocytes. This study aimed to evaluate the extent and severity of liver damage related to the increase in the number of affected periodontal sites. Eighteen rats were divided into three groups of six animals: control, without ligature; periodontitis 1, with a ligature; periodontitis 2, with two ligatures. The rats were submitted to analysis of the following periodontal parameters: gingival bleeding index, probing depth index, tooth mobility and measurement of alveolar bone loss. In the gingival samples the dosages of myeloperoxidase (MPO) and malondialdehyde (MDA) activity were performed. In the hepatic tissue the levels of MDA, glutathione (GSH), total cholesterol, triglycerides and MPO activity were measured. Liver samples were also subjected to histopathological evaluation. Finally, serum levels of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase were measured. The results of periodontal evaluation parameters demonstrated that the periodontitis model was effective. The groups with periodontitis did not differ significantly in relation to the MPO activity and the MDA levels in the gingival tissue samples, but presented significant values when compared to the control group. The group with two ligature had the highest body weight value when compared to the other groups. The comparison between three groups in relation to liver weight did not show significant differences. The histopathological evaluation of the groups with periodontitis demonstrated the presence of steatosis, unlike that observed in the control. In the analysis of the steatosis scores, the groups with ligation did not differ significantly between them, however they presented significant results in comparison with the control group. The parameters of inflammation, necrosis and density of mast cells were observed in the three groups, but no significant differences were observed between them. Analysis of MPO activity in hepatic tissue samples did not show significant changes between study groups. The levels of GSH, MDA, total cholesterol and triglycerides in the groups with periodontitis did not show significant differences, whereas when compared with the control group the data were significant. In conclusion, our results demonstrated that periodontitis-induced steatosis does not show the extent and severity associated with the increase in the number of periodontal sites affected.

Key words: fatty liver, inflammation, rats, periodontal disease, oral medicine

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença crônico-inflamatória (MORITA et al., 2014) causada pela presença de um biofilme bacteriano composto por várias espécies tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, e *Fusobacterium nucleatum* (CORTELLI & CORTELLI, 2008), que desencadeia a degradação dos constituintes do tecido periodontal e perda do suporte ósseo da dentição (YANG et al., 2017).

A periodontite é promovida por uma falha da homeostase dos tecidos, resultante de uma resposta imune alterada contra a microbiota oral residente e, dependendo da intensidade desta resposta, a doença pode se manifestar de maneira agressiva ou crônica, sendo esta última a forma mais comum na clínica odontológica. A forma agressiva é rara, mas severa e acredita-se que esteja interligada a componentes genéticos, porém os mecanismos envolvidos ainda são desconhecidos (MUNZ et al., 2017).

A doença caracteriza-se não apenas como problema de saúde bucal, mas também como uma problemática da medicina em geral, pois aumenta o risco de desenvolvimento de outras doenças, tais como a doença arterial coronária aterosclerótica e pneumonias (MACEDO et al, 2010; SONG et al., 2016; KNIGHT et al., 2016; TONETTI et al., 2017). Além disto, pode desencadear alterações sistêmicas como distúrbios cardíacos (SONG et al., 2016), renais (PONTES ANDERSEN et al., 2008) e principalmente hepáticos (TOMOFUJI et al., 2007).

Recentes estudos vêm demonstrando a associação entre a periodontite e alterações hepáticas, no entanto os mecanismos envolvidos ainda não foram bem elucidados (HAN et al., 2016; GRONKJÆR, 2015). Alguns estudos demonstraram a presença de níveis elevados de marcadores inflamatórios, tais como proteína C-reativa, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), em amostras sanguíneas de pacientes com doença periodontal (MORITA et al., 2014). É provável que este evento seja resultante da proliferação do patógeno e de seus produtos (lipopolissacarídeos -LPS- e proteases) (BASCONES-MARTÍNEZ et al., 2009), que desencadeiam intensa ulceração da região gengival (GRONKJÆR, 2015), permitindo a disseminação dos microrganismos para a circulação.

Estudos epidemiológicos demonstraram que pacientes com periodontite apresentaram um aumento sérico de aspartato aminotransferase (AST) e alanina

aminotransferase (ALT), que são importantes marcadores de lesão hepática. Estes marcadores também são observados em indivíduos com esteatose hepática (TOMOFUJI et al., 2007).

A esteatose não alcoólica é a forma mais comum de doença hepática crônica e é caracterizada pelo acúmulo de gordura nos hepatócitos (NAGAO et al., 2014). A esteatose está intimamente associada à resistência à insulina e pode ser considerada como uma doença multisistêmica associada com inflamação, superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), produzidas pela peroxidação de lipídeos, tais como o malondialdeído (MDA) e a redução de moléculas antioxidantes como a glutathiona (GSH) (VASCONCELOS et al., 2016). Os níveis dessas moléculas são normalmente dosados nos tecidos hepáticos alterados para avaliação de estresse oxidativo.

A intensa inflamação observada na periodontite é o principal fator que permite a associação desta doença com a esteatose hepática. As células inflamatórias e as citocinas pró-inflamatórias desencadeiam alterações locais e sistêmicas que lesionam o tecido hepático. A exacerbada resposta inflamatória promove a elevada produção de EROs ocasionando o desequilíbrio oxidativo. Este altera o fluxo de ácidos graxos nos hepatócitos resultando no acúmulo de lipídeos no interior destas células (RODRIGUES, 2013).

Similarmente ao que ocorre nos seres humanos, a indução de periodontite por meio de ligadura em ratos também desencadeia reabsorção do osso alveolar e infiltrado inflamatório celular nos tecidos gengivais. Um ponto importante é a não exclusão do papel da lesão traumática resultante do contato da ligadura com o tecido na patogênese da periodontite induzida. Desta forma, dados da identificação bacteriana e alterações histológicas resultantes da periodontite induzida por ligadura correspondem àqueles previstos pela maioria das hipóteses que interligam a periodontite com doenças sistêmicas, principalmente as hepáticas (MATSUDA et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2017).

Os estudos presentes na literatura (CARVALHO et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2017) demonstram a associação entre a periodontite e a esteatose através de modelos experimentais utilizando apenas um sítio de indução da periodontite. Assim, este estudo objetivou avaliar a extensão e

severidade dos danos hepáticos relacionados ao aumento no número de sítios periodontais afetados.

Este trabalho divide-se em três capítulos: o primeiro composto pelo referencial teórico, objetivos e materiais e métodos; o segundo pelo artigo experimental, na versão em português, intitulado **Uma ou duas ligaduras induzindo periodontite são suficientes para causar esteatose**, que foi submetido à revista *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*. O terceiro constituído pelas considerações finais e referências bibliográficas do capítulo I.

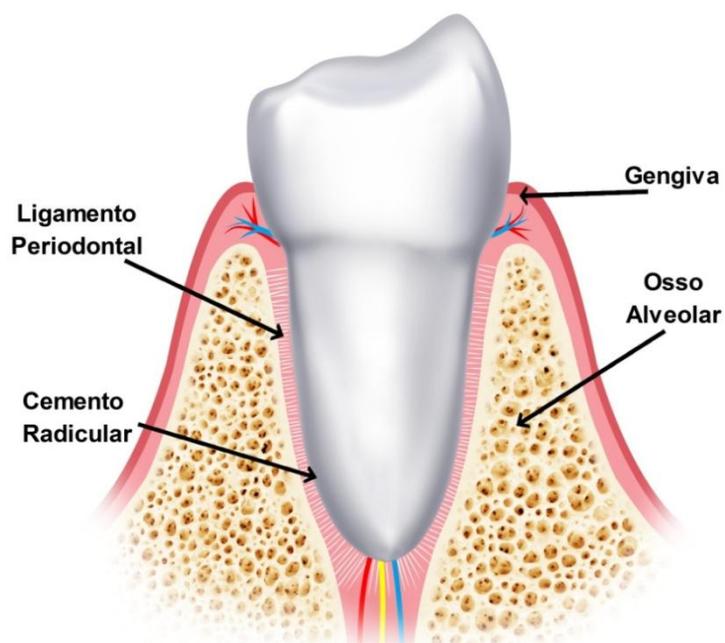
2 CAPITULO I

2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1.1 Anatomia do periodonto

O periodonto é um conjunto de tecidos responsável pela fixação e proteção dos dentes nos ossos maxilar e mandibular (PIERI et al., 2011). É constituído por gengiva; ligamento periodontal, que funciona como uma espécie de rede que envolve o dente; cemento radicular, que recobre a raiz do dente; e o osso alveolar, que circunda e dá suporte a raiz do dente (Figura 1) (HO et al., 2007; HO et al., 2010; ROOKER et al., 2010). Os constituintes do periodonto fornecem base para a fixação e ancoragem, permitindo movimentos mínimos do dente durante a mastigação. Todo este sistema funcional proporciona uma correta articulação entre dente e osso alveolar, conferindo resistência no desempenho da sua função (GOUVEIA, 2009).

Figura 1- Imagem ilustrativa do tecido periodontal normal. As setas indicam a localização da gengiva, do ligamento periodontal, do cemento radicular e do osso alveolar.



Fonte: Próprio autor

2.1.1.1 Gengiva

A gengiva é a parte da mucosa que recobre o processo alveolar estando presente na porção cervical dos dentes. É classificada como tecido epitelial de revestimento estratificado pavimentoso, podendo ser queratinizado ou não. A gengiva possui uma lâmina própria constituída de tecido conjuntivo predominantemente composto por colágeno, proteoglicanas e fibronectina (BARTOLD & NARAYANAN, 2006). Pode apresentar-se de duas formas: livre ou inserida, cada uma apresentando características próprias (BALBINO, 2015).

A gengiva, livre ou marginal, apresenta-se situada cerca de 2 mm acima da linha coronal da crista óssea alveolar até a junção cimento-esmalte, e exibe uma coloração rosada de consistência firme, observada por todo o tecido gengival, vestibular, lingual e palatino do dente, assim como a papila interdentária (BALBINO, 2015). A gengiva inserida ou ligada é contínua com a gengiva marginal/livre, e apresenta-se aderida firmemente ao periósteo que está subjacente ao osso alveolar, sendo demarcada pela junção mucogengival em direção a apical (LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2008; BALBINO, 2015).

2.1.1.2 Ligamento periodontal

O ligamento periodontal (LP) é um tecido conjuntivo fibroso que se interpõe entre as raízes do dente (FLORES et al., 2008), fornecendo suspensão aos dentes (DE LACUEVA FRANÇA, 2013), e a parede interior da cavidade alveolar. No sistema dental, as fibras do ligamento periodontal unem o cimento do dente ao osso alveolar, ao contrário dos ligamentos no sistema esquelético, a maior parte do LP contém elementos neurovasculares. Este tecido mole entre dois corpos mineralizados facilita o movimento relativo entre o dente e o osso distribuindo forças cíclicas mastigatórias. Essas forças fisiológicas são consideradas de curto prazo e permitem a adaptação contínua do complexo ósseo-LP-cimento (HO et al., 2010).

2.1.1.3 Cimento radicular

O cimento é composto por células denominadas cementoblastos, que recobrem as raízes dos dentes. Essas células protegem as raízes dentais das constantes reabsorções que ocorrem no osso. Esta proteção deriva da ausência de receptores na membrana dos cementoblastos para os mediadores que são responsáveis pela intensa remodelação óssea. Desde modo, para que as

reabsorções dentárias ocorram, os cementoblastos devem ser removidos da superfície radicular (CONSOLARO et al., 2011). O cimento é ligado à dentina via uma junção cimento-dentina hidrofílica. Essa junção é conhecida como camada interna do cimento, cimento intermediário ou hiato de colágeno e consiste em fibras de colágeno e células epiteliais remanescente da bainha epitelial de Hertwig (HO et al., 2007).

O processo de cementogênese é dependente da formação das raízes dentais. À medida que a formação da raiz começa, o epitélio interno e externo do esmalte prolifera e forma a bainha epitelial de Hertwig das raízes. Após a formação da dentina radicular, o revestimento epitelial de Hertwig da raiz começa a perfurar e a dentina radicular recém-formada entra em contato com as células dentais foliculares. É especulado que os sinais epiteliais da camada epitelial de Hertwig do revestimento da raiz são responsáveis pela diferenciação das células precursoras do folículo dentário em cementoblastos (RAKIAN et al., 2013).

2.1.1.4 Osso alveolar

O osso alveolar compõe um evento conhecido como processo alveolar, sendo fixado na maxila e na mandíbula. O osso alveolar necessita da presença dos dentes, pois seu desenvolvimento depende da formação e erupção dentária (BALBINO, 2015), ocorrendo reabsorção óssea caso haja a perda de estruturas dentárias (WOLF; RATEISCHAK-PLUSS; RAITEITSCHAK, 2006). O osso alveolar é responsável pelo suporte, sendo constituído por dois tipos de osso, o cortical/compacto e trabecular/esponjoso. O osso compacto, juntamente com os ligamentos periodontais, sobrecarrega o osso esponjoso adjacente às raízes, com isso as trabéculas ósseas (lacunas entre as lamínulas ósseas) assumem uma orientação consistente com as linhas de força. As trabéculas vértico-radiais originam-se no osso esponjoso, anexo ao ápice da raiz e divergem em forma de leque e se inserem ao osso compacto circundante (DE LACUEVA FRANÇA, 2013).

Biologicamente, o osso alveolar é semelhante ao tecido ósseo do restante do corpo, sendo composto também por colágenos tipos I, III e XII associados a cristais de hidroxiapatita, proteoglicanas e ácido glicosialico (SODEK & MCKEE, 2000). O osso alveolar sofre influência do hormônio paratormônio (VASCONCELOS et al., 2014) no entanto, diferentemente do restante do corpo

possui uma rápida remodelação associada à erupção dental e subsequentemente às demandas funcionais da mastigação (ZORRO, 2014).

2.1.2 Doença Periodontal

A doença periodontal (DP) é uma infecção oral, causada por bactérias do biofilme dental (YONEDA et al., 2012) que estimulam uma exacerbada resposta inflamatória no tecido gengival, osso alveolar, cemento e no ligamento periodontal (SOUZA et al, 2015). É definida como uma doença sítio-específica e multifatorial que evolui continuamente. Sua progressão é favorecida pelas características morfológicas dos tecidos afetados, o que a distingue de outras doenças infecciosas, bem como fatores genéticos do hospedeiro que predispõem a uma resposta imune intensa (ALMEIDA et al., 2006; DA SILVA et al., 2016).

A DP, em suas entidades clínicas, é o segundo maior problema de saúde oral no mundo (YONEDA et al., 2012; SOUZA et al, 2015). A gengivite e a periodontite são as mais comuns doenças periodontais (TAYLOR & BORGNAKKE, 2008; ISHIKAWA et al., 2013). Estima-se que entre suas formas clínicas, a gengivite afete 40-85 % da população adulta mundial e a periodontite 11% (SOUZA et al, 2015).

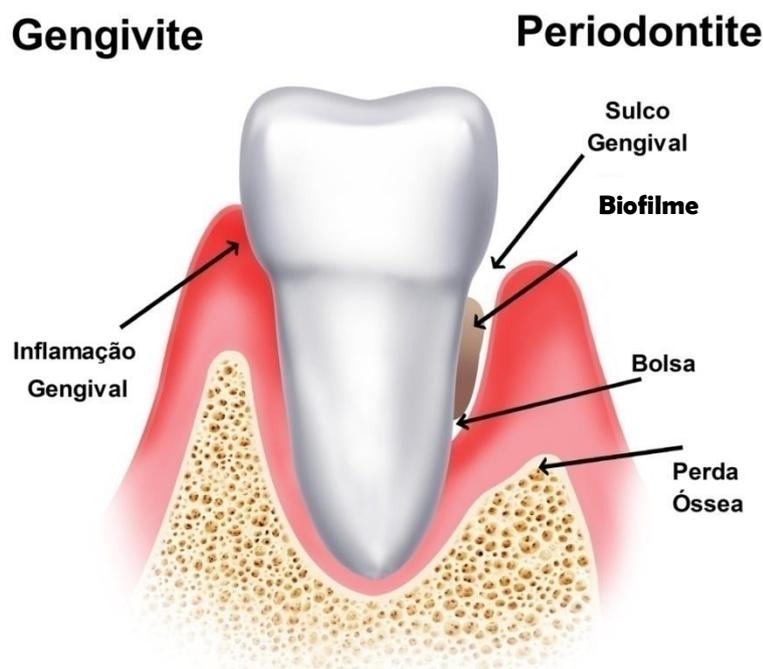
2.1.2.1 Gengivite

A gengivite é uma das doenças mais prevalentes que afetam a população mundial. É uma doença inflamatória superficial decorrente do acúmulo de bactérias no sulco gengival (Figura 2), caracterizada pela presença de eritema, edema, sangramento, sensibilidade, aumento do exsudato gengival e ausência de perda óssea (ANTONINI et al., 2013; MONTERO et al., 2017). Apesar de apresentar alterações patológicas o epitélio juncional se mantém intacto ao dente, sem perda do tecido conjuntivo de inserção. É reversível caso seus agentes etiológicos sejam removidos (ALMEIDA et al., 2006).

2.1.2.2 Periodontite

A periodontite é uma inflamação que resulta na destruição do periodonto e seus constituintes que geralmente decorre da evolução das alterações observadas na gengivite. O acúmulo de placa bacteriana nos tecidos periodontais mais profundos ocasiona uma perda de inserção por destruição do tecido conjuntivo e por reabsorção do osso alveolar. O ligamento periodontal destruído leva à migração apical do epitélio juncional (ALMEIDA et al., 2006) (Figura 2).

Figura 2 - Imagem ilustrativa das diferenças entre gengivite e periodontite. Na gengivite, observa-se a manutenção do tecido gengival e inflamação gengival com eritema. Na periodontite, as estruturas do periodonto apresentam-se lesionadas com retração da gengiva e reabsorção óssea.



Fonte: Próprio autor

O estudo Peso Global das Doenças, feito entre 1990 e 2010, demonstrou que a periodontite ocupa o sexto lugar na lista das doenças inflamatórias mais comuns do mundo (TONETTI et al., 2017; MUNZ et al., 2017), apresentando a prevalência de 11% para as formas graves e acometendo 5 a 30 % da população adulta entre os 25 e 75 anos (TEIXEIRA & PINHO, 2011). É a principal causa de perda dentária em adultos acima de 40 anos (MUNZ et al., 2017).

A periodontite é uma doença multifatorial e sua fisiopatologia está associada a fatores genéticos e ambientais, tais como: má higiene bucal, hábito de fumar e ingestão de bebidas alcoólicas (PHAM; KIEU; NGO, 2017). Sua patogênese envolve a interação com citocinas produzidas pelas células de defesa do hospedeiro a estímulos antigênicos. Essas citocinas são proteínas solúveis que desencadeiam e potencializam o dano tecidual levando à forma mais grave da doença (MISTRY et al., 2016). A doença pode se apresentar como periodontite agressiva de início precoce e de rápida instalação ou periodontite crônica, com

uma evolução mais lenta. Ambas se subdividem nas formas leve, moderada e grave (ANTONINI et al., 2013).

2.1.2.2.1 Periodontite e a microbiota oral

Perfis bacterianos da microbiota endodôntica se modificam conforme o indivíduo. Cada indivíduo abriga uma microbiota singular em termos de variedade e quantidade de espécies (RÔÇAS & SIQUEIRA, 2008; DARVEAU, 2010). Isso corrobora com a ideia de que a periodontite apical tem uma etiologia heterogênea, indicando que apenas um patógeno não pode ser seu agente etiológico. A combinação de múltiplas espécies bacterianas pode desempenhar um papel no desenvolvimento doença (RÔÇAS & SIQUEIRA, 2008). Conseqüentemente, o conhecimento dos perfis da microbiota contribui com as escolhas terapêuticas mais adequadas para o tratamento da periodontite (HELLER et al., 2011).

Apesar de a microbiota oral ser constituída por uma variedade e diversidade de espécies bacterianas, estas se encontram presentes em uma comunidade estável conservando uma relação de simbiose com o hospedeiro saudável. Na presença de alterações nesta simbiose há um aumento qualitativo e quantitativo nos componentes bacterianos, denominado de disbiose (LE MOS, 2016) que se caracteriza pelo desequilíbrio entre os órgãos de barreira (mucosa oral) e os microrganismos que os compõem. A disbiose pode derivar da presença de defeitos genéticos no indivíduo que impossibilita o reconhecimento de agentes patogênicos, além da falha da resposta imunológica contra os microrganismos. (LÉRIAS, 2016).

Recentemente, pesquisas têm demonstrado que a disbiose na cavidade oral induz a periodontite. À medida que a periodontite se desenvolve, a microbiota oral se altera de aeróbios Gram-positivos para um composto principalmente de anaeróbios Gram-negativos. O desenvolvimento da disbiose oral provavelmente ocorre durante um tempo prolongado, modificando gradativamente a relação simbiótica hospedeiro-micróbio com um patógeno (MINEOKA et al., 2008; BEREZOW & DARVEAUH, 2011). Durante esta transformação, a saúde oral do hospedeiro vai se danificando até que ocorra um estado de doença clínica.

Na busca pela compreensão sobre o desenvolvimento do biofilme na doença periodontal foi realizada a formulação de complexos que demonstram as bactérias presentes no biofilme subgengival como descrito por Socransky et al.

(1998). Os complexos microbiológicos formulados se modificam em cor (amarelo, roxo, verde, vermelho e laranja) e potencial patogênico. Os complexos amarelo (espécies de *Streptococcus*) e roxo (*Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*) são comumente relacionados à microbiota normal e saudável da região subgengival (VITORINO, 2015).

O primeiro desses complexos que foi associado à doença periodontal é o chamado complexo laranja, que consiste em espécies anaeróbias Gram-negativas (LANG; SCHÄTZLE; LÖE, 2009; BEREZOW & DARVEAUH, 2011) como *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* (TELES et al., 2010; BEREZOW & DARVEAUH, 2011). À medida que a doença progride, a microbiota desloca-se para o chamado complexo vermelho que consiste nos patógenos periodontais *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* (MINEOKA et al., 2008; TELES et al., 2010; BEREZOW & DARVEAUH, 2011; RAMS; DEGENER; VAN WINKELHOFF, 2014).

2.1.2.2.2 Periodontite e a indução da resposta inflamatória

Componentes bacterianos, como o LPS, possuem um papel importante na resposta imune. Em resposta à infecção bacteriana estabelecida no periodonto, as células do tecido epitelial e conjuntivo são as principais responsáveis pela secreção de citocinas (MARQUES et al., 2011). Após o contato entre o receptor de superfície celular dos neutrófilos e macrófagos, o agente patogênico ou seus componentes desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular acarretando na ativação de enzimas envolvidas na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (BORGES JR et al., 2007), tais como o peróxido de hidrogênio e o radical óxido nítrico, que possuem atividade microbicida (DE LACUEVA FRANÇA, 2013). Esse processo intracelular das EROs sinaliza para gerar citocinas e quimiocinas inflamatórias nos leucócitos. Esses mediadores inflamatórios recrutam mais neutrófilos para expor o LPS, propagando a inflamação (LI et al., 2007).

A resposta inicial para a infecção bacteriana é a reação inflamatória local que ativa o sistema imune inato. A amplificação desta resposta inicial localizada resulta no lançamento de uma matriz de citocinas e outros mediadores levando a propagação da inflamação através dos tecidos gengivais. A falha para encapsular essa “frente inflamatória” dentro do tecido gengival resulta na expansão da resposta para o osso alveolar. O processo inflamatório subsequente leva à

destruição dos tecidos conectivos e a perda óssea alveolar, que sinalizam a existência da periodontite (COCHRAN, 2008).

As citocinas são o ponto central para o início da resposta imune da infecção periodontal (TAKANO et al., 2012), contribuindo para o influxo de leucócitos que desencadeiam propriedades pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. O tipo de resposta imune, pró-inflamatória ou anti-inflamatória, provocada pelas citocinas é determinada, entre outros fatores, pelo tipo de células presentes no tecido. Numerosos tipos de células inclusive os neutrófilos, linfócitos T e B, macrófagos e células plasmáticas têm sido identificadas nas lesões periodontais (AMAYA et al., 2013).

O infiltrado inflamatório celular causa um dano endotelial e uma insuficiência microcirculatória, resultando na diminuição da tensão de oxigênio. Esta condição, tal como a atividade das citocinas e dos fatores de crescimento (VASCONCELOS et al., 2016; AKRAM et al., 2016) e das endotoxinas, estimulam a produção de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), um dos mais importantes fatores proangiogênicos, secretado pelas células mesenquimais sendo reconhecido por receptores presentes nas células endoteliais vasculares. O VEGF está relacionado com a migração de células endoteliais e permeabilidade vascular (VASCONCELOS et al., 2016). A expressão coordenada de e-selectina, moléculas de adesão intercelular (ICAMs) e interleucina-8 (IL-8) juntamente com o VEGF, facilitam o trânsito de neutrófilos do tecido gengival altamente vascularizado para a fenda gengival (DARVEAU, 2010).

A inflamação na periodontite também é marcada pela presença de mastócitos, que estão relacionados com a liberação de aminas vasoativas e TNF- α , aumentando a permeabilidade vascular e a expressão de moléculas de adesão. Esse evento também recruta neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Apesar dos polimorfonucleares constituírem uma das formas de defesa do periodonto, essas células podem liberar EROs, collagenases, e proteases que podem danificar o tecido do hospedeiro (GUIMARÃES et al., 2016). As EROs são produzidas por enzimas intracelulares, como a mieloperoxidase (MPO), de células de defesa, principalmente dos neutrófilos, para destruir os agentes patogênicos (SANTOS, 2010). Além disso, os macrófagos podem atuar como células apresentadoras de

antígeno, promovendo a ativação de linfócitos, e a liberação adicional de mediadores inflamatórios (GUIMARÃES et al., 2016).

As citocinas (TNF- α e interleucinas), a prostaglandina E2, as metaloproteinases de matriz e o óxido nítrico apresentam um papel importante na destruição do osso alveolar. Esses mediadores atuam no metabolismo ósseo aumentando a expressão do receptor ativador do fator RANKL na superfície do osteoblasto, aumentando a ligação RANK–RANKL, e resultando na osteoclastogênese. Consequentemente a presença das citocinas nos sulcos gengivais desencadeiam a diferenciação dos osteoclastos e sua consequente maturação, que resulta na reabsorção óssea (DÍAZ-ZÚÑIGA et al., 2017).

A destruição do tecido decorrente do processo inflamatório e do desequilíbrio entre a proteção oxidante e antioxidante e estresse oxidativo no periodonto estão associados a uma resposta inflamatória sistêmica, possivelmente a devido à passagem de citocinas inflamatórias do tecido gengival inflamado para a circulação periférica (MASI et al., 2011).

2.1.3 Características gerais do fígado

O fígado é o maior órgão visceral dos vertebrados e apresenta funções especializadas importantes para o funcionamento adequado do organismo, entre elas se destacam o metabolismo, a síntese de proteínas e fatores de coagulação e detoxificação. Apresenta um formato de prisma, com ângulos arredondados e uma coloração vermelho-escura. É constituído por três superfícies: diafragmática, visceral e posterior. Exibe uma divisão em unidades funcionais, chamadas lóbulos, que são compostos por células conhecidas como hepatócitos. Os lóbulos são nutridos pelo sangue advindo das veias periféricas. Estas compreendem pequenas ramificações das artérias hepáticas e ramificações da veia portal. O sangue penetra em canais chamados sinusoides, que são protegidos por macrófagos, as células de Kupffer (VIEIRA, 2014).

Os hepatócitos são células epiteliais, morfologicamente uniformes, possuindo uma forma poliédrica, núcleo central e em sua grande maioria apresentam apenas um único núcleo (DUARTE, 2014). Organizam-se em forma de cordões espessos que se anastomosam entre si formando os lóbulos hepáticos (ALOIA, 2006) que se arranjam ao redor da veia central (COELHO,

2011). Constituem cerca de 80% da massa celular do fígado dos mamíferos (VU et al., 2017).

Entre o hepatócito e o sinusóide localiza-se o espaço de Disse. O hepatócito apresenta dois lados, o basolateral, voltado para o espaço de Disse e está relacionado com a absorção do conteúdo sanguíneo e secreção de proteínas plasmáticas; e o apical, constituído por microvilosidades que formam os canalículos onde é secretada a bile (COELHO, 2011). Essas microvilosidades ocupam grande parte do espaço de Disse permitindo a troca de substâncias com a circulação sanguínea (DUARTE, 2014). Devido a sua intensa metabolização os hepatócitos apresentam uma variedade de organelas. Os retículos endoplasmáticos são geralmente bem evidentes (ALOIA, 2006).

O fígado é responsável pela determinação das concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol, ácidos graxos livres e lipoproteínas. Os lipídeos encontrados no tecido hepático apresentam origem incerta. As possíveis fontes que, juntamente com a lipogênese, contribuem com o estoque de lipídeos no fígado são os ácidos graxos vindos dos tecidos periféricos a partir da lipólise e gorduras obtidas da dieta, que chegam ao fígado na forma de quilomicrons. Nos hepatócitos os lipídeos podem ser encaminhados para diversas rotas contribuindo com os ciclos exógenos e endógenos (EDER, 2009).

A via exógena do metabolismo lipídico está associada com os lipídeos obtidos da dieta que sofrem absorção intestinal. Para atravessar o lúmen intestinal no plasma, os lipídeos são emulsificados e hidrolisados dentro do lúmen. Essa emulsificação ocorre através de ácidos biliares produzidos nos hepatócitos que possuem propriedades anfífilas permitindo a hidrolização dos lipídeos por enzimas conhecidas como lipases. Os enterócitos absorvem os lipídeos e os resintetizam em partículas de quilomicrons. Estes fazem parte de um grupo de macromoléculas conhecidas como lipoproteínas que são compostas por uma fração lipídica (triglicerídeos, fosfolipídeos, colesterol livre e esterificado) e outra protéica, as apoproteínas (Apo) (BASSANI, 2011; BECHMANN et al., 2012).

Os quilomicrons são secretados no sistema linfático e posteriormente penetram na corrente sanguínea, sofrendo a ação da enzima lipase lipoprotéica encontrada na superfície das células endoteliais. A lipase realiza a digestão dos triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos que são capturados pelos adipócitos. As

moléculas resultantes deste processo são os quilomicrons remanescentes (QR) que acessam a corrente sanguínea e chegam ao fígado, onde são endocitados e metabolizados em colesterol e frações protéicas. A endocitose do QR ocorre através do reconhecimento da apoproteína E. Ao fim do metabolismo exógeno dos lipídeos há a formação de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (BASSANI, 2011; BECHMANN et al., 2012).

O metabolismo endógeno dos lipídeos tem início com a produção de VLDL nos hepatócitos. A VLDL é uma lipoproteína formada a partir de ácidos graxos que podem ser derivadas da circulação, da própria síntese hepática e da hidrólise dos QR. É a principal lipoproteína responsável pelo transporte endógeno dos lipídeos, ou seja, transporta os lipídeos sintetizados no fígado aos tecidos periféricos. À medida que os triglicerídeos são retirados das VLDLs, estas recebem colesterol esterificado das lipoproteínas de alta densidade (HDL) advindas dos tecidos periféricos. Esse processo é efetuado pela proteína de transferência de colesterol esterificado. Quando as VLDLs sofrem novamente a ação da lipase lipoprotéica perdem 21% de triglicerídeos resultando na formação das lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e posteriormente como lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Estas recebem colesterol esterificado presentes nas HDLs em troca de triglicerídeos, apresentando menor concentração de triglicerídeo e maior teor de colesterol esterificado. As LDLs são a principal fonte de transporte e entrega do colesterol e triglicerídeos para os tecidos periféricos (MARTELLI, 2015; BASSANI, 2011; BECHMANN et al., 2012).

A síntese hepática dos ácidos graxos (lipogênese *de novo*- conversão de carboidrato em lipídeos) é realizada no citoplasma dos hepatócitos para onde é transportada a acetilcoenzima A (acetil-CoA) formada na mitocôndria a partir do piruvato. A membrana interna da mitocôndria é impermeável a acetil-CoA, por isso seus carbonos são transportados na forma de citrato. Todas as reações são catalizadas pela ácido graxo sintetase em conjunto com acetil-CoA carboxilase e malonil-CoA. Os ácidos graxos resultantes das reações se combinam por esterificação com o glicerol para formar triglicerídeos armazenáveis (MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2009; BECHMANN et al., 2012).

No fígado também é sintetizada a maior porcentagem do colesterol endógeno na forma de ésteres de colesterol, colesterol biliar ou ácidos biliares. A

partir de três moléculas de acetil-CoA é formado o hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) através da ação das enzimas tiólase e a síntase do HMG-CoA, presentes no citoplasma. A molécula de HMG-CoA é transformada em mevalonato, com seis carbonos, pela enzima HMG-CoA redutase. Em seguida, a partir do mevalonato ocorre à formação de unidades isoprenoides (bases estruturais do esqueleto esteroide do colesterol) por perda de dióxido de carbono. A combinação dessas bases estruturais dará origem ao colesterol (RAMALHO, 2014).

2.1.4 Doença hepática

O tecido hepático está exposto a diversas agressões incluindo metabólicas, tóxicas, infecciosas e neoplásicas. O acometimento do tecido pode ser reversível, se a causa etiológica for removida, ou irreversível. A doença hepática pode ser primária do fígado como o carcinoma hepatocelular ou secundária causada por metástases, infecções e também em decorrência da elevada ingestão de álcool (SILVA, 2005).

2.1.4.1 Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

A DHGNA é considerada uma das principais causas de doença hepática crônica em países ocidentais. É caracterizada pelo acúmulo de lipídeos no fígado, principalmente de triglicerídeos, atingindo mais de 5% dos hepatócitos. De acordo com o percentual de hepatócitos afetados, a DHGNA apresenta-se como leve, se menos de 30% dos hepatócitos demonstrarem acúmulo de lipídeos; moderada, quando 60% dos hepatócitos são acometidos; grave, quando ultrapassa 60%. O espectro da doença varia de simples esteatose a esteatohepatite não alcoólica (EHNA) sendo esta última associada à presença de infiltrado inflamatório, necrose celular, balonização dos hepatócitos e a presença de fibrose e cirrose, sendo capaz de evoluir para carcinoma hepatocelular (DE ALWIS & DAY, 2008; RODRIGUES, 2013; CHALASANI et al. 2017). O diagnóstico de DHGNA requer a exclusão do consumo de álcool, de marcadores de doença hepática viral, congênita e autoimune (MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2009; RODRIGUES, 2013).

A fisiopatologia da DHGNA tem sido explicada de acordo com a hipótese conhecida como "dois golpes" (*two hits*). O "primeiro golpe" representa o acúmulo hepático de lipídeos, esteatose hepática, aumentando a suscetibilidade do fígado

a lesões mediadas por um "segundo golpe", intercedido por citocinas inflamatórias ou adipocinas, pela disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, que podem resultar na esteatohepatite e/ou fibrose (DOWMAN; TOMLINSON; NEWSOME, 2009). Os mecanismos que promovem a progressão da esteatose hepática à esteatohepatite, fibrose e carcinoma hepatocelular ainda não são bem elucidados. O que dificulta a compreensão da evolução da DHGNA é o fato de ser considerada poligênica e multifatorial, ou seja, sofre influências de características genéticas e de fatores ambientais. Os fatores de risco para a DHGNA podem ser classificados em “não modificáveis”, como características genéticas, etnia, sexo e idade; “modificáveis” ou ambientais, relacionados a hábitos alimentares, inatividade física, consumo de álcool e outras drogas (SOUSA, 2012).

A DHGNA didaticamente é dividida em primária, relacionada com os aspectos da síndrome metabólica, como a obesidade, a diabetes, as dislipidemias e a resistência à insulina (RI); secundária, interligada a outras origens, como história prévia de cirurgias abdominais, uso de substâncias hepatotóxicas (glicocorticoides, amiodarona, antiretrovirais) ou doenças infecciosas (hepatites, infecção pelo HIV, periodontite) (YONEDA et al., 2012; RODRIGUES, 2013). A resistência a insulina é o maior fator de risco para o desenvolvimento de DHGNA (MUDALIAR et al., 2013).

A DHGNA é considerada uma desordem hepática com prevalência estimada na população geral entre 3 a 24% (COTRIM et al., 2011) sendo 15% em países asiáticos (BELLENTANI et al., 2010). Um estudo epidemiológico no Japão encontrou prevalência de 26% em homens e de 12,7% em mulheres, no sexo feminino e a doença elevou-se com a idade, principalmente na pós-menopausa (RODRIGUES, 2013). Os países ocidentais apresentam uma prevalência de 20 a 30% (BELLENTANI et al., 2010). Na população norte-americana, de ambos os sexos, a prevalência varia de 3% a 24%, e no Brasil a DHGNA acomete 33,5% da população (BELLENTANI & MARINO, 2009).

2.1.4.1.1. Esteatose hepática (EH)

A esteatose hepática constitui umas das alterações hepatocelulares mais frequentes em biópsias hepáticas (RABELO, 2010). É uma condição clínico-patológica que se caracteriza por acúmulo de lipídeos no interior dos hepatócitos. Independente da causa, o quadro patológico se assemelha em todos os casos

(SOLER et al., 2008). Os mecanismos envolvidos no acúmulo de lipídeos no tecido hepático são: diminuição da síntese e secreção de lipoproteínas, aumento da lipólise no tecido adiposo, principalmente o visceral, aumento do fluxo de ácidos graxos livres (AGL) no hepatócito, alteração da β -oxidação nas mitocôndrias dos hepatócitos e aumento na lipogênese *de novo* hepática. A liberação de ácido graxo livre no fígado é responsável por quase dois terços do acúmulo de lipídeos (KRAWCZYK; BONFRATE; PORTINCASA, 2010; TILG & MOSCHEN, 2010; RODRIGUES, 2014).

A principal causa do acúmulo de lipídeos nos hepatócitos é a RI. A ligação da insulina ao seu receptor celular estimula translocação das vesículas do transportador de glicose (GLUT-4) para a membrana celular, aumentando a entrada de glicose na célula. Na RI há bloqueio na fosforilação do receptor, impedindo internalização da glicose. Na ausência de glicose como fonte energética para a célula, ocorre o excesso de insulina na circulação levando ao aumento da atividade lipolítica para utilização de lipídeos como fonte alternativa de energia. O aumento da atividade lipolítica induz um maior fluxo de AGL no fígado, que em decorrência da beta-oxidação mitocondrial e da produção e secreção de VLDL insuficientes se acumulam no citoplasma. A mudança na fonte energética também estimula a síntese lipídica nos hepatócitos. Além disso, na RI ocorre a inibição das lípases lipoprotéicas bloqueando a exportação de triglicérides na forma de VLDL (PINTO et al, 2012; RODRIGUES, 2013).

A beta-oxidação ocorre normalmente nas mitocôndrias, mas devido ao excesso de AGL esse processo pode ficar sobrecarregado dando origem as EROs, que ativam vias alternativas, microsomal e peroxissomos, que potencializam sua produção. Com essa fabricação exacerbada de oxidantes, a capacidade antioxidante da célula se excede acarretando o estresse oxidativo. Este induz a peroxidação lipídica que consiste na agressão dos ácidos graxos poliinsaturados (AGP) dos fosfolipídeos de membrana por EROs (FRANÇA et al. 2013). O dano celular decorrente do estresse oxidativo resulta na ativação da resposta inflamatória (DOWMAN; TOMLINSON; NEWSOME, 2009), como a liberação de citocinas, em especial o TNF- α , que também induzem a produção de EROs (FRANÇA et al. 2013).

O excesso de lipídeos nos hepatócitos pode ser observado com a presença de vacúolos. Estes permitem a classificação morfológica da esteatose em macrovesicular e microvesicular e de acordo com a localização no órgão podem ser do tipo focal ou difusa. A macrovesicular é a forma mais comum, sendo representada por hepatócitos constituídos por um grande e único vacúolo que desloca o núcleo para a parte periférica da célula; apresenta associação com a elevada ingestão de álcool, RI, obesidade e nutrição parenteral prolongada. A microvesicular é caracterizada pela presença de inúmeros e pequenos vacúolos no citoplasma celular; ocorre principalmente na gravidez, na intoxicação por tetraciclina e em algumas formas da hepatite fulminante em crianças (MARTELLI, 2015; RODRIGUES, 2014).

A EH é uma das principais causas de morbidade e mortalidade ligadas a doenças do fígado. Na maioria dos indivíduos, a esteatose é diagnosticada após testes com marcadores de lesão hepática, AST e ALT e fosfatase alcalina; ultrassonografia ou tomografia computadorizada, que indicam a presença de um fígado gorduroso; biopsia hepática, embora tenha elevado custo e risco ao paciente é o método que admite uma visão mais ampla da natureza da esteatose, possibilitando o acesso à morfologia da lesão, sendo considerado padrão ouro. Elevações nas transaminases hepáticas AST e ALT entre leve e moderada são os achados mais comuns nos exames laboratoriais (SOLER et al., 2008; SEIXAS, 2011; SOUSA, 2012).

2.1.5 Associação entre esteatose e a periodontite

Pesquisas epidemiológicas relatam uma associação entre a periodontite e as doenças hepáticas ao demonstrar que em pacientes acometidos por periodontite os níveis séricos de AST, ALT e colinesterase estão aumentados (YAMAMOTO et al., 2010; GRØNKJÆR, 2015). No estudo de Tomofuji et al. (2007) foi realizada a indução da periodontite através da aplicação de LPS e proteases em ratos, a partir deste experimento foi observado que a inflamação periodontal e o estresse oxidativo resultante induziram a DHGNA. Além disso, estudos complementares em ratos têm demonstrado que a periodontite possa ser um fator de risco para que ocorra a progressão da esteatose alcoólica e não alcoólica para fibrose (TOMOFUJI et al., 2008).

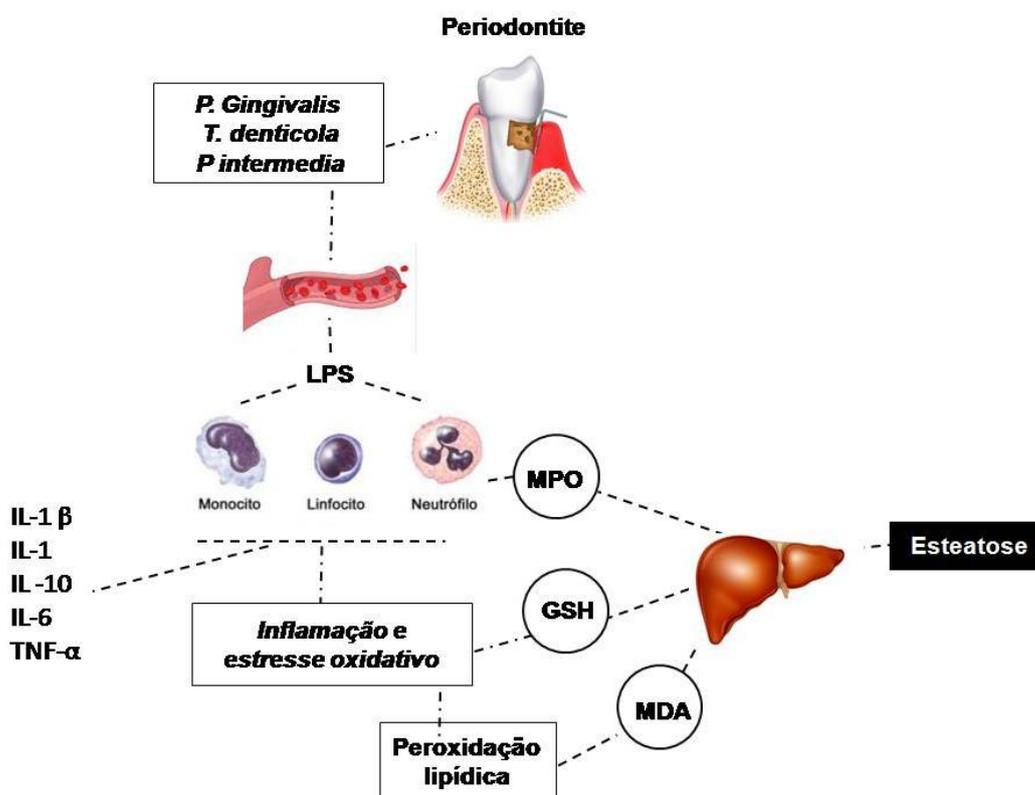
A crônica exposição a bactérias periodontais, seus produtos e às citocinas está associada com o desenvolvimento de doenças sistêmicas. Durante a progressão da periodontite, as bolsas periodontais profundas criam um aumento no espaço subgengival por depósitos de bactérias, que levam a ulceração do tecido (TOMOFUJI et al., 2007). Essa lesão permite o acesso dos periodontopatógenos e seus produtos aos vasos da região com consequente disseminação para a circulação. Na região gengival de um paciente com periodontite é observado um aumento e uma extensão do número de vasos sanguíneos, este evento também pode facilitar a migração do LPS para o sistema circulatório. Com a migração do LPS ocorre uma estimulação amplificada da resposta imune para locais fora da região inicialmente lesionada (Figura 3). Esse fato explica o papel do LPS na lesão hepática observada em vários modelos animais (YAMAMOTO et al., 2010) .

O fígado desempenha um importante papel fisiológico na detoxificação do LPS. Em caso de choque séptico, um aumento na concentração sérica de LPS está relacionado à liberação de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio. Tal condição estimula uma resposta patológica potente no tecido hepático (TOMOFUJI et al., 2007). A inflamação local do periodonto também contribui com o desenvolvimento da esteatose, pois os mediadores inflamatórios liberados podem levar ao recrutamento de neutrófilos ativados que ao migrar para o fígado potencializam as lesões nos hepatócitos e nas células endoteliais vasculares, como resultado da liberação de produtos oxidantes e proteases (HAN et al., 2016). As citocinas, como o TNF- α , contribuem com a disfunção mitocondrial ao promover a formação de ânion superóxido e espécies reativas de nitrogênio através da indução de óxido nítrico sintase, inativando enzimas da cadeia respiratória e danificando o DNA (MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2009), essas modificações alteram o metabolismo lipídico permitindo o acúmulo de ácidos graxos nos hepatócitos.

A exacerbada liberação das citocinas na periodontite pode acarretar a RI, esse fato pode ser explicado pela ação das citocinas, como TNF- α , na indução da fosforilação dos receptores de insulina, impedindo que esta última seja incapaz de fosforilar os seus receptores. Como mencionado anteriormente, na RI há uma mudança na fonte energética das células, de glicose para lipídeos, que resulta no

fluxo excessivo de ácidos graxos para o fígado. O efeito do TNF- α é mais intenso na inibição da lipogênese (via inibição da lipase, do GLUT-4 e da acetil-Coa sintetase), potencializando a lipólise que permite a liberação de ácidos graxos para circulação (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Figura 3- A imagem ilustra a associação da periodontite com o desenvolvimento da esteatose. Na periodontite, o tecido periodontal produz citocinas inflamatórias que juntamente com os patógenos periodontais e seus componentes translocam-se para o fígado através da circulação sanguínea. O LPS estimula as células inflamatórias, desencadeando uma intensa inflamação que resulta no estresse oxidativo. O estresse oxidativo leva a diminuição de antioxidantes como o GSH e colabora com uma peroxidação lipídica que resulta no acúmulo de gordura nos hepatócitos e formação de MDA. A enzima MPO liberada por neutrófilos também colabora com o estresse oxidativo.



Legenda: LPS-Lipopolissacarídeo, MPO-mieloperoxidase, IL- Interleucina, TNF- α - Fator denecrose tumoral alfa, GSH-glutathiona, MDA- malondialdeído

Fonte: Próprio autor

O estresse oxidativo presente na periodontite é outro evento que explica a relação da doença com a esteatose (Figura 3). Como dito anteriormente, as EROs tem um papel importante no processo inflamatório. As EROs, além de participar do recrutamento de citocinas, podem causar agressão nos AGPs iniciando peroxidação lipídica dentro das células. Com a peroxidação ocorre a formação de aldeídos como malondialdeído (MDA). A formação dessas moléculas ocorre apenas através da peroxidação dos AGPs, que são preferencialmente oxidadas para diminuir a resistência da ligação carbono-hidrogênio em grupos metilenos entre pares de carbonos insaturados. Como o número de ligações duplas nos AGPs aumenta, suas taxas de peroxidação aumentam exponencialmente (ROLO; TEODORO; PALMEIRA, 2012).

O tecido adiposo também é afetado pelo estresse oxidativo. As EROs possuem a capacidade de agir como moléculas sinalizadoras, além de originar danos a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos celulares. O dano do tecido adiposo resultante do excesso de EROs desencadeia a ampliação da síntese e secreção das adipocinas, que estimulam a formação de um ambiente pró-inflamatório. Os adipócitos secretam elevada quantidade de TNF- α , IL-6, IL-8 e a proteína 1 quimiotática dos macrófagos. O próprio tecido adiposo é responsável pelo manejo da resposta corporal à insulina. Como resultado dessas alterações o metabolismo lipídico no tecido adiposo é desregulado acarretando também na lipólise (MAGGIONI, 2014; RODRIGUES 2014).

A elevada liberação de citocinas tanto como resultado direto da ação das bactérias e suas endotoxinas como através da estimulação dos adipócitos promove a intensa migração de células inflamatórias que participam na liberação de citocinas e enzimas como a mieloperoxidase (MPO). A MPO, pela reação com peróxido de hidrogênio, forma radicais livres e substâncias oxidantes difusíveis com atividade antimicrobiana, mas devido a elevada inflamação na periodontite há uma intensa produção de MPO também ocasionando um dano oxidativo (ROMAN; WENDLAND; POLANCZYK, 2008; FERREIRA et al., 2011).

Os aldeídos, como MDA, tem meia-vidas mais longas que as EROs e apresentam o potencial para se difundir a partir dos sítios de origem para atingir um alvo distante intra ou extracelular, ampliando seus efeitos no estresse oxidativo (ROLO; TEODORO; PALMEIRA, 2012), a potencialização do estresse

oxidativo é proporcional ao aumento da peroxidação de lipídeos. Este intenso estresse oxidativo tem como consequência à diminuição de antioxidantes naturais, como a glutathione (GSH) que possui sua maior concentração no tecido hepático em comparação com outros tecidos. A diminuição de GSH contribui com a progressão da esteatose (CHEN et al., 2007) (Figura 3).

2.1.6 Indução de periodontite por ligadura

Segundo Souza et al. (2005), a utilização de modelos animais tem viabilizado a análise de alguns aspectos do periodonto que dificilmente seriam estudados em humanos. Nos estudos abrangendo os tecidos periodontais, o rato é comumente empregado por apresentar algumas vantagens em relação a outros animais. Dentre estas vantagens, pode-se salientar o baixo custo, facilidade de manipulação, capacidade de manutenção em condição livre de germes e a possibilidade de desenvolvimento de imunodeficiências.

A periodontite, diferentemente de outras doenças infecciosas, é comumente observada em animais. No rato, a anatomia do dente e do periodonto é muito semelhante a dos seres humanos, tornando a utilização desses animais uma ótima ferramenta em pesquisas periodontais. A indução da periodontite por estímulo mecânico local, com a inserção de um fio de ligadura ao redor da região cervical dos primeiros molares inferiores, com a promoção da formação do biofilme tem sido amplamente utilizada em experimentos de periodontite induzida em animais (RODINI, 2005).

A agressão mecânica induzida instala uma inflamação crônica, admitindo a observação de achados clínicos semelhantes aos encontrados em pacientes acometidos pela doença. O modelo de indução da periodontite por ligadura permite, portanto a realização de diversos estudos em relação à patogênese, evolução e terapêutica (RODINI, 2005).

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

Avaliar a extensão e severidade da esteatose relacionadas ao aumento no número de sítios periodontais afetados.

2.2.2 Objetivos específicos

- Induzir a periodontite por inserção de uma ligadura nos primeiros molares inferiores dos animais;
- Associar os danos periodontais com as lesões hepáticas;
- Descrever o percentual de esteatose entre os animais com indução de periodontite por ligadura analisando os parâmetros bioquímicos e histológicos;
- Avaliar os parâmetros clínico-inflamatórios nos animais que receberam indução de periodontite por ligadura;
- Quantificar os marcadores de estresse oxidativo e inflamatórios na amostras gengivas dos animais;
- Mensurar os marcadores de estresse oxidativo e de inflamação no fígado dos animais;
- Determinar os níveis séricos dos marcadores bioquímicos de lesão hepática nas amostras de soro dos animais;
- Determinar as concentrações de triglicerídeos e colesterol total presentes no tecido hepático dos animais;
- Realizar a avaliação histológica das amostras de fígado para avaliar a presença de esteatose.

2.3 MATERIAS E MÉTODOS

2.3.1 Tipo de estudo e aspectos éticos da pesquisa

O estudo experimental caracterizou-se como descritivo-analítico. O experimento foi executado na Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Reis Veloso, Parnaíba, Piauí. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Piauí (CEP/UFPI) sob o protocolo de nº 061/ 2014.

2.3.2 Animais

Neste estudo, foram utilizadas 18 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando $152,8 \pm 17,8$ g. Os animais foram mantidos a uma temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro / escuro de 12 horas e acesso livre à água e alimentos. Os animais foram eutanasiados de acordo com as recomendações da Resolução Normativa nº6, de 10 de julho de 2012 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.3.3 Delineamento experimental

As ratas foram divididas de forma aleatória em três grupos de seis: controle (sem ligadura), periodontite 1 (com uma ligadura, por 20 dias) e periodontite 2 (com duas ligaduras, por 20 dias). Para indução da periodontite foi utilizada uma ligadura de nylon (000), inserida ao redor dos primeiros molares inferiores dos animais. Antes da indução os animais foram submetidos à anestesia geral utilizando-se 35 mg/kg do anestésico cetamina e 15 mg/kg do relaxante muscular xilazina, administrados por via intramuscular. No grupo periodontite 1, a ligadura foi colocada em torno do primeiro molar inferior direito. No grupo periodontite 2, os fios de ligadura foram colocados ao redor de ambos os molares inferiores. Após 20 dias de indução da periodontite, foram retiradas amostras de sangue do plexo retro-orbital dos 18 animais para análises bioquímicas. Antes da eutanásia foi mensurado o peso das ratas e após o procedimento foi realizada a pesagem dos fígados.

2.3.4 Parâmetros clínicos

2.3.4.1 Índice de sangramento gengival (ISG)

A bolsa periodontal ou sulco gengival dos primeiros molares inferiores dos grupos periodontite foram sondados por dez segundos e classificados de acordo

como descrito por Liu et al (2012) nos escores de 0 a 5. Escore 0: margem gengival e papila gengival (GMP) são saudáveis, sem sangramento visível após uma ligeira sonda. Escore 1: GMP são levemente inflamados e sem sangramento observado após uma ligeira sonda. Escore 2: GMP são levemente inflamadas; alterações na cor, ausência de edema e a ocorrência de hemorragia de ponto após uma ligeira sonda são observadas. Escore 3: GMP são moderadamente inflamados; alterações na cor, edema leve e sangramento após uma ligeira sonda enquanto o sangue ainda está no sulco gengival são visíveis. Escore 4: GMP estão gravemente inflamados; alterações na cor, edema grave e sangramento após uma ligeira sonda enquanto o fluxo de sangue para fora sulco gengival são visíveis. Escore 5: GMP estão gravemente inflamados; alterações na cor, grave edema, úlcera, sangramento após uma ligeira sonda ou hemorragia espontânea e sangue são observados fluindo para fora do sulco gengival.

2.3.4.2 Índice de profundidade de sondagem (IPS)

Para avaliação de PS foi utilizada uma sonda periodontal (ponta de 0,2 mm de raio). Três pontos foram avaliados e utilizados na medição (mésio-vestibular, disto-vestibular e médio-vestibular) (LIU et al., 2012).

2.3.4.3 Mobilidade dentária

A avaliação da mobilidade dentária foi realizada como descrito por Xu et al (2006). A mobilidade dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo foi classificada da seguinte forma: 0 = ausência de mobilidade, 1 = ligeira mobilidade (vestibular-palatal), 2 = mobilidade moderada (vestibular-palatal e mesial-distal) e 3 = mobilidade severa (vertical, presença de movimento dentro e fora alvéolo).

2.3.5 Medição da perda de osso alveolar (POA)

A medida da POA foi utilizada para demarcar a junção cimento-esmalte (JEC). Posteriormente a dissecação do tecido mole, as mandíbulas foram impregnadas com solução aquosa de azul de metileno a 1%. A imagem da altura do osso alveolar para cada hemimandíbula foi capturada com o uso de um estereomicroscópio em uma ampliação de 30x. Para a avaliação do osso alveolar, mediram-se três pontos da região lingual. As medidas foram realizadas ao longo do eixo da raiz, da seguinte forma: a) POA -1, a distância foi adquirida medindo a altura da junção cimento-esmalte para a crista alveolar, na porção anterior (mesial) dos primeiros molares; B) POA -2, a distância foi obtida medindo a altura

da junção cimento-esmalte para a crista alveolar, na raiz mesial dos primeiros molares inferiores; C) POA - 3, a distância foi alcançada medindo a altura da junção cimento-esmalte para a crista alveolar, na raiz intermediária dos primeiros molares inferiores. Após a análise dos três pontos das mandíbulas a seguinte fórmula foi utilizada $POA:POA = POA-1/3 + POA-2/3 + POA-3/3$. As imagens foram avaliadas através do sistema de análise (ImageJ v.1.48 Media Cybernetics).

2.3.6 Avaliação histopatológica do fígado

As amostras foram armazenadas em formaldeído tamponado neutro a 10%. O processamento histológico das amostras seguiu os seguintes passos: desidratação, soluções crescentes de álcool etílico; diafanização, solução de xilol; inclusão, impregnação por parafina; microtomia, cortes das amostras incluídas em 6 μm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina; azul de toluidina, para avaliação da presença e densidade de mastócitos (DMC); ácido periódico de Schiff (PAS), para avaliação de glicogênio. As lâminas foram observadas por meio de microscopia convencional. Para a análise histológica do fígado foram capturadas imagens por campo das lâminas histológicas para avaliar, de acordo como o descrito por Turlin et al. (2009), os seguintes parâmetros: a) esteatose, b) inflamação, c) necrose e d) densidade de mastócitos. A esteatose foi avaliada semiquantitativamente, por meio da porcentagem de células com esteatose seguindo uma escala de cinco graus: 0, ausente ou presente em <5% de hepatócitos; grau 1, $\geq 5\%$ e <25%; grau 2, $\geq 25\%$ e <50%; grau 3, $\geq 50\%$ e <75% e grau 4, $\geq 75\%$. A avaliação da inflamação e da necrose seguiu a seguinte classificação: 0: nenhuma; 1: <2 focos/campo; 2: 2-4 focos/campo; 3: > 4 focos/campo (MAGGIONI, 2014). Para a avaliação da densidade de mastócitos foram contadas o total de células coradas com azul de toluidina, posteriormente, dividiu-se o número de células pela área encontrada, obtendo-se a densidade de mastócitos por μm^2 (SOUZA, 2012).

2.3.7 Dosagens

2.3.7.1 Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO foi avaliada através do acúmulo de neutrófilos no tecido gengival e hepático. Sumariamente, 40 mg de tecido foram macerados e homogeneizados em 50 mg/mL de tampão de potássio contendo 0,5% de

brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). O homogeneizado foi centrifugado a 3.900 rpm durante 6 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e a partir dele foi avaliada a atividade de MPO por meio da determinação da variação na absorbância em equipamento de ELISA no comprimento de onda de 450 nm, utilizando o dicloridrato de O-dionisidina em reação com peróxido de hidrogênio a 1% (SANTOS-SILVA et al., 2013). A atividade da MPO foi descrita como unidades/ mg de tecido. Uma unidade da atividade de MPO foi definida pela conversão de 1 µmol de peróxido de hidrogênio em água em 60 segundos a 24°C, como descrito por Chaves et al (2013). Os resultados foram expressos como unidade de MPO/mg de tecido.

2.3.7.2 Níveis de Glutathiona (GSH)

A concentração de GSH em amostras de fígado foi determinada de acordo com o método de Sedlak e Lindsay (1968), que consiste na reação do grupo sulfidril com 5,5' - ditiobis (2 - ácido nitrobenzóico) (DTNB- reagente de Ellman) com o tiol livre, que resulta em um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. O produto resultante foi mensurado por meio de espectrofotometria (absorbância a 412nm) (SILVA, 2009; ANDRADE, 2012). Foram pesados entre 50 a 100 mg das amostras de fígado que em seguida serão homogeneizadas em 5 ml de EDTA 0,02M gelado. Foram retirados 4,0 ml deste homogeneizado, que foi misturado com 3,2 ml de água destilada e 0,8 ml de ácido tricloroacético 50%. As amostras foram agitadas e centrifugadas a 3000 g por 15 minutos. Do sobrenadante foi retirado 2,0 ml, neste foi acrescentado 4 ml de TRIS 0,4 M (pH 8,9) e 0,1 ml de DTNB 0,01 M. Em seguida, as amostras preparadas foram agitadas e misturadas para a homogeneização. Por último foram lidas as absorbâncias das amostras no espectrofotômetro (SILVA, 2009; ANDRADE, 2012). Os dados foram expostos como µg/g de tecido.

2.3.7.3 Níveis de Malondialdeído (MDA)

Os níveis de MDA em amostras de fígado e de gengiva foram determinados de acordo com o método descrito por Uchiyama e Mihara (1978) que frequentemente é utilizado para estimar a peroxidação lipídica. Este método tem como princípio a extração deste composto usando um solvente orgânico (n-butanol), determinando-se a concentração de MDA que será expressa como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A concentração de TBARS

foi expressa em nmol/g de tecido.

As amostras de fígado foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -70°C imediatamente após a coleta e foram lavadas com soro fisiológico gelado (4°C), para extrair quaisquer vestígios de sangue. As amostras foram pesadas e homogeneizadas em KCL gelado 1,15%, a partir disto resultou uma solução ácida com concentração a 10%. Uma alíquota de 0,5 ml foi retirada de cada amostra e acrescida 1,0 ml da solução aquosa de TBA 0,6% e 3,0 ml da solução de ácido fosfórico (H_3PO_4 , 1%). Logo após, a mistura foi colocada em banho fervente por 45 minutos, resfriada em banho de gelo e em seguida adicionado 4,0 ml de N-butanol. Após 2 minutos de agitação, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 r.p.m. Por meio de espectrofotometria (comprimento de onda 520 nm e 535 nm) foi medida a absorbância da camada orgânica sobrenadante (fase butanólica). A diferença entre os valores obtidos de cada leitura, resultantes de cada comprimento de onda foi utilizada para calcular a concentração de TBARS, usando a regressão linear a partir de uma curva padrão (SILVA, 2009; ANDRADE, 2012).

2.3.7.4 Níveis de Colesterol e triglicerídeos no tecido hepático

Para a dosagem de colesterol e de triglicerídeos foi utilizada uma proporção de 2 para 1 de clorofórmio e de metanol, respectivamente, e o composto resultante foi utilizado para a dosagem tecidual. Foram macerados 100 g de amostra em 1 ml de reagente clorofórmio/metanol. Logo após, foi realizada a centrifugação das amostras em 5000rpm durante 5 minutos. A quantidade de sobrenadante utilizada de acordo com o indicado no kit enzimático para colesterol total e triglicerídeo. O sobrenadante foi homogeneizado juntamente com os reagentes preparados do Kit. As amostras foram analisadas por espectrofotometria (FIGUEIREDO, 2012).

2.3.7.5 Dosagens bioquímicas do soro

As amostras de sangue retiradas do plexo retro-orbital foram armazenadas e refrigeradas. Posteriormente foram centrifugadas para obtenção de 100 μl de soro. A dosagem dos níveis dos marcadores de lesão hepática (AST e ALT) foi realizada por meio de técnica colorimétrica com a utilização de Kits Labtest, seguindo as instruções do fabricante, e analisadas por espectrofotometria.

2.3.8 Análise estatística

Os dados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão e/ou mediana \pm intervalo quartílico. Para avaliação da distribuição e normalidade dos dados foi utilizado o teste estatístico de *Shapiro-Wilk*. A diferença entre os grupos foi analisada por meio do teste de variância (ANOVA) e do teste de *Student-Newman-Keuls*, para os dados paramétricos, e do teste de *Kruskal-Wallis* para dados não paramétrico, seguido pelo teste de *Dunn* para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3 CAPITULO II

3.1 ARTIGO

Uma ou duas ligaduras induzindo periodontite são suficientes para causar esteatose

Título de circulação: Periodontite promove esteatose

Larissa dos Santos Pessoa¹, Felipe Rodolfo Pereira da Silva¹, Even Herlany Pereira Alves¹, Luiz Felipe de Carvalho França¹, David di Lenardo¹, Joaquina dos Santos Carvalho¹, Victor Brito Dantas Martins¹, Francisca Beatriz de Melo Sousa², Luan Kelves Miranda de Souza², Karina Oliveira Drumond¹, Jand-Venes Rolim Medeiros², Jefferson Soares de Oliveira³, Daniel Fernando Pereira Vasconcelos¹.

¹ Laboratório de Análise e Processamento Histológico (LAPHIS), Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, Piauí, Brasil;

² Laboratório de Fisiofarmacologia Experimental (LAFEX), Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, Brasil;

³ Laboratório de Biologia e Bioquímica de Plantas (BIOqPLANT), Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, Brasil;

Autor correspondente: Daniel Fernando Pereira Vasconcelos, Universidade Federal do Piauí – UFPI, *Campus* Ministro Reis Veloso, Colegiado de Biomedicina, Av. São Sebastião, 2819, Reis Veloso, Parnaíba - PI – Brasil, 64204-035. Phone: +55 86 3323 5248; Fax: +55 86 3323 5444. E-mail: vasconcelos@ufpi.edu.br

Resumo:

Introdução: A periodontite é uma doença crônica que devido principalmente à intensa resposta inflamatória desencadeia alterações sistêmicas, como alterações hepáticas. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a extensão e severidade da esteatose relacionada ao aumento no número de locais periodontais afetados.

Métodos: Dezoito ratos foram divididos em três grupos: controle, periodontite com ligadura e periodontite com duas ligaduras. Foram avaliados os seguintes parâmetros: índice de sangramento gengival, medida de profundidade de sondagem, mobilidade do dente, perda de osso alveolar, malondialdeído (MDA), atividade de mieloperoxidase (MPO) para tecidos periodontais; análise do peso total do fígado e dos animais; avaliação histopatológica do tecido hepático; níveis de glutathiona (GSH), MDA, MPO, colesterol e triglicerídeos no fígado; níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

Resultados: Os dados da avaliação periodontal demonstraram que o modelo de periodontite funcionou. Os grupos com periodontite não diferiram significativamente em relação à atividade de MPO e aos níveis de MDA nas amostras de gengiva, contudo apresentaram diferenças significativas com o grupo controle. Em relação ao peso corporal o grupo periodontite 2 foi o que apresentou a maior média. A análise do peso do fígado não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Na análise histológica dos grupos com periodontite, observou-se esteatose, embora os grupos não apresentaram diferenças significativas entre eles. Os níveis de GSH, MDA, colesterol total e triglicerídeos no tecido hepático não foram alterados entre grupos com periodontite, entretanto mostraram diferenças significativas em comparação com o grupo controle. A atividade de MPO no tecido hepático e os níveis séricos de AST e ALT não apresentaram diferenças significativas entre os três grupos.

Conclusão: Em conclusão, nossos resultados demonstraram que uma ou duas ligaduras induzindo periodontite foram suficientes para causar esteatose no fígado, demonstrando que a esteatose promovida pela periodontite induzida não apresenta uma maior extensão e severidade com o aumento nos números de sítios afetados.

Palavras-chave: antioxidante, agentes anti-inflamatórios, delineamento experimental, medicina periodontal

Introdução

A periodontite é uma doença inflamatória crônica (1), causada pela presença de um biofilme bacteriano composto por várias espécies como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* (2) que afetam os tecidos periodontais e podem desencadear alterações sistêmicas, como doenças cardiovasculares (3-4), doenças renais (5-6), e principalmente alterações hepáticas (7). Embora existam estudos que associem periodontite com alterações no fígado (8), o mecanismo pelo qual este processo ocorre ainda não é bem compreendido (8-9). Alguns estudos demonstraram níveis elevados de marcadores inflamatórios em amostras sanguíneas de pacientes com doença periodontal (10). É provável que este evento resulte da proliferação do patógeno e seus produtos (lipopolissacarídeos - LPS- e proteases) (11), que desencadeiam ulceração intensa da região gengival (8), permitindo a disseminação de microorganismos para a circulação.

Semelhante ao observado em seres humanos, o uso da indução de periodontite com ligadura em ratos também desencadeia reabsorção do osso alveolar e infiltrado de células inflamatórias nos tecidos gengivais. Um ponto importante é a não exclusão do papel da lesão traumática resultante do contato da ligadura com o tecido na patogênese da periodontite induzida. Assim, os dados sobre as alterações bacterianas e histológicas resultantes da periodontite induzida por ligadura correspondem aos previstos pela maioria das hipóteses que ligam a periodontite com doenças sistêmicas, especialmente as doenças hepáticas (11-12).

Estudos epidemiológicos demonstraram que os pacientes com periodontite apresentam um aumento sérico de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), que são marcadores importantes de lesão hepática. Estes marcadores também são observados em indivíduos com esteatose (8-12).

A esteatose não alcoólica é a forma mais comum de doença hepática crônica e é caracterizada pelo acúmulo de gordura nos hepatócitos (13). A

esteatose está intimamente associada à síndrome metabólica e pode ser considerada como uma doença multissistêmica associada à inflamação, superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), produzidas por peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA) e a redução de moléculas antioxidantes como a glutatona (GSH).¹¹ Os níveis dessas moléculas são normalmente dosados em amostras de fígados alterados para avaliação experimental do estresse oxidativo (14).

Na literatura só existem relatos de estudos demonstrando o alcance do dano hepático, esteatose, através de modelos experimentais empregando apenas um sítio de indução da periodontite. Assim, este estudo objetivou avaliar a extensão e severidade da esteatose relacionada ao aumento no número de locais periodontais afetados.

Material e métodos

Animais

Neste estudo, utilizaram-se 18 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando 152.8 ± 17.8 g. Os animais foram mantidos a uma temperatura de 23 ± 2 ° C, com ciclo claro/escuro de 12 horas e acesso livre à água e alimentos. A eutanásia dos animais foi realizada de acordo com as recomendações da Resolução Normativa nº6, de 10 de julho de 2012 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Piauí (CEP/UFPI) sob o protocolo de nº 061/ 2014.

Delineamento experimental

As ratas foram divididas de forma aleatória em três grupos de seis: controle (sem ligadura), periodontite 1 (com uma ligadura, por 20 dias) e periodontite 2 (com duas ligaduras, por 20 dias). Para indução da periodontite foi utilizada um fio de nylon (000), colocado ao redor dos primeiros molares inferiores dos animais. Antes da indução os animais foram submetidos à anestesia geral por via intramuscular com de 35 mg/kg do anestésico cetamina e de 15 mg/kg do relaxante muscular xilazina. No grupo periodontite 1, a ligadura foi colocada em torno do primeiro molar inferior direito. No grupo periodontite 2, os fios de ligadura foram colocados ao redor de ambos os molares inferiores. Após 20 dias de

indução da periodontite, foram retiradas amostras de sangue do plexo retro-orbital dos 18 animais para análises bioquímicas. Antes da eutanásia foi mensurado o peso dos animais e após o procedimento foi realizada a pesagem dos fígados.

Índice de sangramento gengival (ISG)

Os primeiros molares dos animais foram sondados na região da bolsa periodontal ou sulco gengival durante dez segundos. A classificação do índice de sangramento gengival seguiu os escores de 0 a 5 de acordo como o descrito por Liu et al. (15)

Índice de profundidade de sondagem (IPS)

Para avaliação PS utilizou-se uma sonda periodontal (ponta de 0,2 mm). Três pontos foram avaliados e utilizados na medida (mésio-vestibular, disto-vestibular e médio-vestibular) (15).

Mobilidade dentária

A avaliação da mobilidade dentária foi realizada de acordo como o descrito por Xu et al. (16) A mobilidade dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo foi classificada da seguinte forma: 0 = ausência de mobilidade, 1 = ligeira mobilidade (vestibular-palatal), 2 = mobilidade moderada (vestibular-palatal e mesial-distal) e 3 = mobilidade severa (vertical, presença de movimento dentro e fora do alvéolo).

Medição da perda de osso alveolar (POA)

A medida da POA foi utilizada para demarcar a junção cimento-esmalte (JEC). Posteriormente a dissecação do tecido mole, as mandíbulas foram impregnadas com solução aquosa de azul de metileno a 1%. A imagem da altura do osso alveolar para cada hemimandíbula foi capturada com o uso de um estereomicroscópio em uma ampliação de 30x. Para a avaliação do osso alveolar, mediram-se três pontos da região lingual. As medidas foram feitas ao longo do eixo da raiz, da seguinte forma: a) POA -1, a distância foi adquirida medindo a altura da junção cimento-esmalte para a crista alveolar, na porção anterior (mesial) dos primeiros molares; B) POA -2, a distância foi obtida medindo a altura da junção cimento-esmalte para a crista alveolar, na raiz mesial dos primeiros molares inferiores; C) POA - 3, a distância foi alcançada medindo a altura da junção cimento-esmalte para a crista alveolar, na raiz intermediária dos primeiros molares inferiores. Após a análise dos três pontos das mandíbulas a seguinte

fórmula foi utilizada POA: $POA = POA-1/3 + POA-2/3 + POA-3/3$. As imagens foram avaliadas por sistema de análise de imagens (ImageJ v.1.48 Media Cybernetics).

Concentração de malondialdeído (MDA) nos tecidos hepático e gengival

Os níveis de MDA nas amostras de fígado e gengiva foram determinados de acordo com o método descrito por Mihara e Uchiyama (17), que é frequentemente utilizado para estimar a peroxidação lipídica.

Atividade da mieloperoxidase (MPO) nos tecidos hepático e gengival

A análise da atividade MPO foi realizada para determinar de forma indireta a infiltração de neutrófilos no tecido gengival e hepático seguindo a metodologia descrita por Chaves et al. (18)

Níveis de glutathiona (GSH) no tecido hepático

Os níveis de GSH nas amostras de fígado foram determinandos de acordo com a metodologia descrita por Sedlak e Lindsay (19). O teste consiste na reação do grupo sulfidrílo com 5,5 '-ditio (ácido 2-nitrobenzóico) (reagente de DTNB-Ellman) com o tiol livre, que resulta em um dissulfureto misto mais ácido 2-nitro-5-tio-benzóico. O produto resultante foi analisado por espectrofotometria.

Avaliação histopatológica do tecido hepático

As amostras foram armazenadas em formaldeído tamponado a 10%. O processamento histológico das amostras seguiu os seguintes passos: desidratação, soluções crescentes de álcool etílico; diafanização, solução de xilol; inclusão, impregnação por parafina; microtomia, cortes das amostras incluídas em 6 μ m de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina; azul de toluidina, para avaliação da presença e densidade de mastócitos (DMC); ácido periódico de Schiff (PAS), para avaliação de glicogênio. As lâminas foram observadas por meio de microscopia convencional. Para a análise histológica do fígado foram capturadas imagens de cada campo das lâminas histológicas para avaliar, como descrito por Turlin et al. (20), os seguintes parâmetros: a) esteatose, b) inflamação, c) necrose e d) densidade de mastócitos. A esteatose foi avaliada semiquantitativamente, por meio da análise da porcentagem das células com esteatose seguindo uma escala de cinco graus: 0, ausente ou presente em <5% de hepatócitos; grau 1, $\geq 5\%$ e <25%; grau 2, $\geq 25\%$ e <50%; grau 3, $\geq 50\%$ e <75% e grau 4, $\geq 75\%$. A avaliação da inflamação e da necrose seguiu a

seguinte classificação: 0: nenhuma; 1: <2 focos/campo; 2: 2-4 focos/campo; 3: >4 focos/campo. Para avaliação da densidade de mastócitos foram contadas o total de células coradas com azul de toluidina, posteriormente, dividiu-se o número de células pela área encontrada, obtendo-se a densidade de mastócitos por μm^2 (21).

Níveis de colesterol total e triglicerídeos no tecido hepático

Para a dosagem de colesterol e de triglicerídeos foi utilizada uma solução contendo clorofórmio: metanol (2:1). Foram macerados 100 g de amostra em 1 ml de reagente clorofórmio/metanol. Logo após, foi realizada a centrifugação das amostras em 5000rpm durante 5 minutos. A quantidade de sobrenadante utilizada foi baseada naquela indicada no kit enzimático para colesterol total e triglicerídeo. O sobrenadante foi homogeneizado juntamente com os reagentes preparados. As amostras foram analisadas por espectrofotometria (22).

Concentrações séricas de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) .

Os níveis dos marcadores de lesão hepática (AST e ALT) foram dosados por meio de técnica colorimétrica com a utilização de Kits bioquímicos, seguindo as instruções do fabricante e a análise feita por espectrofotometria.

Análise estatística

Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão e/ou intervalo mediano \pm quartílico. O teste estatístico de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para verificar a distribuição e a normalidade dos dados. A diferença entre os grupos foi analisada utilizando o teste de variância (ANOVA) e o teste *Student-Newman-Keuls* para os dados paramétricos e o teste de *Kruskal-Wallis* para dados não paramétricos, seguido pelo teste de *Dunn* para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

Índices de sangramento gengival e de profundidade de sondagem

A papila gengival nos grupos com ligadura mostrou-se fortemente inflamada, com alterações na cor, edema e sangramento após uma leve sonda (Figura 1E e 1F). Ambos os grupos com ligadura (Figura 1B, 1C, 1E e 1F) quando comparados ao grupo controle (Figura 1A e 1D) apresentaram diferenças clínicas

em relação ao tecido gengival. Não há diferenças significativas entre os grupos periodontite 1 e 2 em relação ao ISG, no entanto, há uma diferença significativa quando os dois grupos são comparados com o grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 1G).

Na análise PS, as médias encontradas para cada grupo foram $0,8 \pm 0,1$ mm para o grupo controle, $3,3 \pm 0,1$ mm para o grupo periodontite com uma ligadura e $3,3 \pm 0,1$ mm para o grupo periodontite com duas ligaduras. Houve diferenças significativas em relação a PS entre o grupo controle e os grupos com ligadura ($p < 0,05$, Figura H). No entanto, não houve diferenças significativas entre os grupos periodontite 1 e 2 ($p > 0,05$, Figura H).

Medição da perda óssea alveolar

As alterações observadas no osso alveolar dos grupos controle, uma ligadura e duas ligaduras estão representadas nas figuras 1I, 1J e 1K, respectivamente. Houve diferenças significativas entre os grupos com ligadura em relação ao grupo controle ($2,0 \pm 0,1$ mm, $5,4 \pm 0,2$ mm, $5,2 \pm 0,2$ mm para os grupos controle, uma ligadura e duas ligaduras, respectivamente). No entanto, não houve alterações significativas entre os grupos periodontite 1 e 2 ($p > 0,05$) (Figura 1L).

Mobilidade dentária

Não foram observadas alterações significativas entre os grupos periodontite 1 e 2, porém a comparação dos grupos com ligadura com o grupo controle demonstrou diferenças significativas ($p < 0,05$) (Figura 1M).

Atividade de MPO e os níveis de MDA no tecido gengival

Os dois grupos com periodontite induzida quando comparados ao grupo controle apresentaram diferenças significativas em relação à atividade de MPO ($3,4 \pm 0,8$ U/mg de tecido, $51,4 \pm 7$ U/mg de tecido, $56,1 \pm 7,0$ U/mg de tecido, para os grupos controle, uma ligadura e duas ligaduras, respectivamente, $p < 0,05$), mas os grupos periodontite 1 e 2 não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$) (Figura 2A). Na comparação entre grupos periodontite 1 e 2, os níveis de MDA não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), porém os dois grupos apresentaram aumento na peroxidação lipídica quando comparados ao grupo controle (Controle com $37,8 \pm 6,0$ nmol/g de tecido, uma ligadura com $79,2 \pm 4,3$ nmol/g de tecido e duas ligaduras com $77,3 \pm 2,8$ nmol/g de tecido) (Figura 2B).

Peso corporal e do fígado dos animais

O grupo com duas ligaduras apresentou o maior valor do peso corporal em comparação com os grupos controle e uma ligadura. O grupo com uma ligadura foi o que obteve a menor média de massa corporal. A comparação entre os três grupos em relação ao peso do fígado não demonstrou diferenças significativas ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Avaliação histopatológica do fígado

A Figura 3A, 3D e 3G demonstra o tecido hepático do grupo controle, no qual os hepatócitos apresentam conformação normal. O grupo com uma ligadura (Figura 3B, 3E e 3H) e aquele com duas ligaduras (Figura 3C, 3F e 3I) apresentaram esteatose, sendo possível a observação de alguns hepatócitos com esteatose do tipo macrovesicular e núcleos periféricos, além da diminuição da organização em forma de cordões. A análise dos escores de esteatose dos tecidos hepáticos de ambos os grupos com periodontite demonstrou índices elevados de esteatose em comparação ao grupo controle ($1,6 \pm 0,1$, $2,3 \pm 0,2$, $2,3 \pm 0,2$, controle, uma ligadura e dois grupos de ligadura, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 4A). No entanto, os grupos periodontite 1 e 2 não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$). Todos os grupos demonstraram a presença de inflamação, necrose e densidade de mastócitos, no entanto a comparação entre os três grupos em relação a esses parâmetros não evidenciou diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 4B, 4C e 4D).

Atividade de MPO no tecido hepático

A atividade de MPO foi analisada para medir o infiltrado de neutrófilos. Não foram observadas diferenças significantivas entre os grupos do estudo em relação aos níveis de MPO no tecido hepático ($2,0 \pm 0,2$ U/mg de tecido, $2,8 \pm 0,6$ U/mg de tecido, $2,8 \pm 0,6$ U/mg de tecido, grupos controle, um ligadura e duas ligaduras, respectivamente ($p > 0,05$) (Figura 4E).

Níveis de GSH e de MDA no tecido hepático

Os dois grupos que receberam indução de periodontite demonstraram uma diminuição significativa de GSH no fígado em relação ao grupo controle ($420,7 \pm 47,8$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, $155,0 \pm 55,7$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, $181,8 \pm 43,7$ $\mu\text{g/g}$ de tecido, grupos controle, uma ligadura e duas ligaduras, respectivamente). Contudo, não foram evidenciadas diferenças significantivas ($p > 0,05$) entre os grupos periodontite

1 e 2 (Figura 5A). As concentrações de MDA nos grupos com ligaduras foram elevadas quando comparadas ao grupo controle ($64,0 \pm 5,1$ nmol/g, para o grupo controle, $115,3 \pm 14,0$ nmol/g, para o grupo com uma ligadura, $101,3 \pm 13,8$ nmol/g, para o grupo com duas ligaduras), apresentando diferenças significativas. Os grupos periodontite 1 e 2 quando comparados entre si não obtiveram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 5B).

Níveis de colesterol total e de triglicérides no tecido hepático

Os grupos com periodontite apresentaram amostras de fígado com altas concentrações de colesterol total em relação ao grupo controle (grupos controle, $2,4 \pm 0,4$ mg/g de tecido; uma ligadura, $5,1 \pm 0,2$ mg/g de tecido; duas ligaduras, $5,2 \pm 1,0$ mg/g de tecido; $p < 0,05$) (Figura 5C), evidenciando diferenças significativas entre eles. Entretanto, a comparação entre os grupos periodontite 1 e 2 não apresentou alterações significativas ($p < 0,05$). Os níveis de triglicérides nas amostras de fígado dos grupos com ligadura também demonstraram um aumento significativo em relação ao grupo controle (Controle: $66,1 \pm 7,5$ mg/g de tecido, uma ligadura: $131,5 \pm 8,7$ mg/g de tecido, duas ligaduras: $125,8 \pm 16,1$ mg/g de tecido; $p < 0,05$) (Figura 5D). Contudo, entre os grupos com periodontite não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$).

Concentrações séricas de AST e ALT

Os valores de AST e ALT na comparação entre os três grupos não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Discussão

A associação entre a periodontite e as alterações hepáticas já vem sendo relatada na literatura (23-24). Estudos demonstram um aumento de periodontopatógenos em pacientes diagnosticados com esteatose em relação a indivíduos sem lesões hepáticas, sugerindo que a periodontite e a esteatose estejam relacionadas. A relação entre ambas pode ser explicada pelo acesso a sítios distantes, como o fígado, de bactérias periodontais, endotoxinas, citocinas e células inflamatórias através da circulação (25). No tecido hepático, esses agentes potencializam a inflamação e o estresse oxidativo decorrentes da periodontite ocasionando a peroxidação lipídica que resulta no acúmulo de gordura nos hepatócitos (7-15).

Já existem estudos demonstrando a presença de esteatose em modelos de periodontite induzida em ratos com apenas uma ligadura (14). Nosso estudo foi o primeiro a realizar a avaliação de esteatose em modelo de indução de periodontite com a inserção de ligadura em ambos os primeiros molares inferiores, mostrando que mais de um local de indução não promove a extensão e severidade da esteatose. A análise histológica de ambos os grupos apresentou lâminas histológicas com hepatócitos degenerados e desorganizados. No entanto, a avaliação de marcadores de lesão hepática e de estresse oxidativo demonstrou que não há diferença significativa ($p > 0,05$) na extensão da esteatose entre os grupos com uma ligadura e duas ligaduras.

Os dados clínicos para a determinação da periodontite ISG, PS, mobilidade dentária, POA não apresentaram diferenças significativas entre os grupos com uma ligadura e duas ligaduras, demonstrando que o modelo de indução permaneceu constante em ambos os grupos (14). Os resultados desses parâmetros conferem eficácia ao modelo de indução de periodontite utilizado. A periodontite confirmada através dos parâmetros acima permite a análise de suas consequências sistêmicas.

Devido ao intenso processo inflamatório presente na periodontite há um aumento no tecido gengival da atividade da MPO (6,13,26). A MPO é uma enzima presente nos neutrófilos, comumente utilizada como marcador indireto de infiltração de neutrófilos em processos inflamatórios (26). Nossos resultados evidenciaram que os níveis da atividade de MPO foram elevados nos grupos com indução em comparação com o grupo controle, em concordância com o observado na literatura (6,13,26). Essa exacerbada resposta inflamatória resulta na superprodução de espécies reativas de oxigênio que desencadeiam a peroxidação lipídica, apresentando como produto o MDA. O aumento deste marcador no tecido gengival foi observado em estudos com periodontite (6,27,28). Nossos resultados também demonstraram um aumento nos níveis de MDA nos grupos com periodontite em relação ao grupo controle. A comparação entre os grupos periodontite 1 e 2 não mostrou diferenças significativas na análise de MPO e MDA.

A doença do fígado conhecida como esteatose ocorre devido ao acúmulo de lipídios nos hepatócitos. O acúmulo de gordura nas células hepáticas pode

levar à degeneração e alteração na conformação dessas células (14-28). Em nosso estudo essas alterações foram observadas na análise histopatológica das lâminas dos grupos com periodontite. A comparação histológica entre os grupos periodontite 1 e 2 não evidenciou extensão da esteatose. A avaliação dos escores de esteatose revelou que há diferenças significativas entre os grupos com indução e o grupo controle. Os parâmetros de inflamação, de necrose e de densidade de mastócitos foram observados em todos os grupos do estudo, contudo não apresentaram alterações significativas. De acordo com o descrito por Vasconcelos et al. (14), esses parâmetros também não apresentaram importante alteração entre os animais do grupo periodontite e do grupo controle.

De acordo com o observado na literatura os níveis de atividade MPO apresentam-se elevados em amostras de tecido hepático (29). Em nosso estudo, apesar da identificação da inflamação nas amostras de fígado, a atividade de MPO não apresentou alterações significativas entre os grupos estudados. A ausência de diferenças entre os grupos quanto à inflamação pode explicar os dados da atividade de MPO no fígado.

O estresse oxidativo causa alterações nos níveis de MDA e GSH no tecido hepático (14). Os valores de MDA foram elevados nas amostras de fígado dos grupos com periodontite em relação ao grupo controle, entretanto a análise entre os grupos com uma ligadura e duas ligaduras não apresentou diferenças significativas. GSH é um antioxidante intracelular que tem várias funções biológicas atribuídas principalmente à desintoxicação eletrofílica e eliminação de oxidantes. A maior concentração de GSH é encontrada em hepatócitos em comparação com outros tecidos. O principal papel do hepatócito no organismo é participar do metabolismo e desintoxicação, portanto, é um alvo para muitas drogas ingeridas e outros xenobióticos. A diminuição de GSH no fígado como resultado do estresse oxidativo observado na periodontite potencializa o dano hepático (28). Isto explica os baixos níveis de GSH no fígado nos grupos com periodontite. A comparação entre os grupos periodontite 1 e 2 não evidenciou diferenças significativas.

O fígado desempenha um papel central na homeostase lipídica (28). Com dano hepático devido à periodontite, o metabolismo lipídico sofre alterações resultando em níveis aumentados de colesterol total e triglicerídeos. Em nosso

estudo as concentrações de colesterol total e triglicerídeos dos grupos com periodontite foram elevadas em relação ao grupo controle, mas não indicaram diferenças significativas quando comparados entre si. ALT e AST são marcadores de lesão hepática que ajudam no diagnóstico da esteatose (24). Em pacientes com esteatose observaram-se níveis elevados desses marcadores no sangue. Em alguns estudos utilizando ratos foi observado que os valores ALT e AST não apresentam diferenças estatísticas significantes entre o grupo periodontite e o controle (14-28), nossos resultados estão em concordância com esses dados.

Em conclusão, nossos resultados demonstraram que uma ou duas ligaduras induzindo periodontite foram suficientes para causar esteatose no fígado, demonstrando que a esteatose promovida pela periodontite induzida não apresenta uma maior extensão e severidade com o aumento nos números de sítios afetados.

Agradecimentos

Estudo apoiado pela Universidade Federal do Piauí (UFPI - BIAMA 03/2014 e Edital PIBIC 2014/2015), CNPq (455104 / 2014-0).

Contribuições dos autores

A análise estatística para o manuscrito foi realizada por DFPV e JSO. LSP, FRPS, EHPA, LFC, DDL, JSC, VBDM, FBMS, LKMS, KOD, JVRM, DFPV e JSO contribuíram para a coleta de dados e preparação do manuscrito. Todos os autores aprovaram a versão final para apresentação.

Conflitos de interesse

O autor declara que não há conflito de interesses.

Referências

1. Pihlstrom, BL, Bryan SM, Newell WJ. Periodontal diseases. *The Lancet*. 2005; 366: 1809-1820.
2. Deng ZL, Szafranski SP, Jarek M, Bhujju S, Wagner-Döbler I. Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. *Sci Rep*. 2017; 7:3703.

3. Song IS, Han K, Park Y M, Ji S, Jun SH, Ryu JJ, et al. Severe Periodontitis Is Associated with Insulin Resistance in Non-abdominal Obese Adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016; 101:4251-4259.
4. Knight ET, Liu J, Seymour GJ, Faggion CM, Cullinan MP. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2016; 71:22-51.
5. Pontes Andersen CC, Holmstrup P, Buschard K, Flyvbjerg A. Renal alterations in prediabetic rats with periodontitis. *J Periodontol.* 2008; 79:684-90.
6. França LFC, Vasconcelos ACCG, Silva FRP, et al. Periodontitis changes renal structures by oxidative stress and lipid peroxidation. *J Clin Periodontol.* 2017; 44: 568-576.
7. Tomofuji T, Ekuni D, Yamanaka R, Kusano H, Azuma T, Sanbe T, et al. Chronic administration of lipopolysaccharide and proteases induces periodontal inflammation and hepatic steatosis in rats. *J Periodontol.* 2007; 78:1999-2006.
8. Han P, Sun D, Yang J. Interaction between periodontitis and liver diseases (Review). *Biomed Rep.* 2016; 5:267-276.
9. GRØNKJÆR, LL. Periodontal disease and liver cirrhosis: A systematic review. *SAGE Open Med.* 2015; 3:2050312115601122.
10. Morita T, Yamazaki Y, Fujiharu C, Ishii T, Seto M, Nishinoue N, et al. Serum γ -glutamyltransferase level is associated with periodontal disease independent of drinking habits in Japanese adults. *Med Sci Monit.* 2014; 20: 2109–2116.
11. Bascones-Martínez A, Muñoz-Corcuera M, Noronha S, Mota P, Bascones-Ilundain C, Campo-Trapero J. Host defence mechanisms against bacterial aggression in periodontal disease: Basic mechanisms. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009; 14:680-5.
12. Akinkugbe AA, Slade GD, Barritt AS, Cole SR, Offenbacher S, Petersmannm A, et al. Periodontitis and Non-alcoholic Fatty Liver Disease, a population-based cohort investigation in the Study of Health in Pomerania. *J Clin Periodontol.* 2017; 44(11):1077-1087, 2017.
13. Nagao Y, Kawahigashi Y, Sata M. Association of periodontal diseases and liver fibrosis in patients with HCV and/or HBV infection. *Hepat Mon.* 2014; 14:e23264.

14. Vasconcelos DFP, Silva FRP; Pinto MESC, Santana LA, Souza IG, Miranda de Souza LK, et al. Decrease of Pericytes is Associated With Ligature-Induced Periodontitis Liver Disease in Rats. *J Periodontol*. 2017; 88:e49-e57.
15. Liu R, Li N, Liu N, Zhou X, Dong ZM, Wen XJ, et al. Effects of systemic ornidazole, systemic and local compound ornidazole and pefloxacinmesylate on experimental periodontitis in rats. *Med Sci Monit*. 2012; 18:BR95-BR102.
16. Xu Y, Wei W. A comparative study of systemic sub antimicrobial and topical treatment of minocycline in experimental periodontitis of rats. *Arch Oral Biol*. 2006; 51:794-803.
17. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*. 1978; 86:271–278.
18. Chaves L de S, Nicolau LA, Silva RO, Barros FCN, Freitas ALP, Aragão KS, et al. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. *Immuno pharmacol Immunotoxicol*. 2013; 35: 93-100.
19. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 1968; 24:192–205.
20. Turlin B, Ramm GA, Purdie DM, Lainé F, Perrin M, Deugnier Y, et al. Assessment of hepatic steatosis: comparison of quantitative and semiquantitative methods in 108 liver biopsies. *Liver Int*. 2009; 29: 530-535.
21. Franceschini B, Russo C, Dioguardi N, Grizzi F. Increased liver mast cell recruitment in patients with chronic C virus-related hepatitis and histologically documented steatosis. *J Viral Hepat*. 2007; 14:549-555.
22. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 226:497-509.
23. Furuta M, Ekuni D, Yamamoto T, Irie K, Koyama R, Sanbe T, et al. Relationship between periodontitis and hepatic abnormalities in young adults. *Acta Odontol Scand*. 2010; 68:27-33.
24. Yoneda M, Naka S, Nakano K, Wada K, Endo H, Mawatari H, et al. Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastro enterol*. 2012; 12:16.

25. Caroll GC, Sebor RJ. Dental flossing and its relationship to transient bacteremia. *J Periodontol.* 1980, 51: 691-692.
26. Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuardi LR, Sousa TS, Taba M Jr, Teofilo JM, et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2010; 37:180-90.
27. Ambati M, Rani KR, Breddy PV, Suryaprasanna J, Dasari R, Gireddy H. Evaluation of oxidative stress in chronic periodontitis patients following systemic antioxidant supplementation: A clinical and biochemical study. *J Nat Sci Biol Med.* 2017; 8: 99–103.
28. Carvalho JS, Vasconcelos ACCG, Alves EHP, Carvalho AS, Silva FRP, França LFC, et al. Steatosis caused by experimental periodontitis is reversible after removal of ligature in rats. *J Periodontal Res.* 2017; 52(5):883-892.
29. Rensen SS, Slaats Y, Nijhuis J, Jans A, Bieghs V, Driessen A, et al. Increased Hepatic Myeloperoxidase Activity in Obese Subjects with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Am J Pathol.* 2009; 175:1473-82.

Legendas:

Figura 1. A) e D) Representama análise clínica do grupo controle. B) e E) Análise clínica do grupo periodontite com uma ligadura. B) mostrando o lado esquerdo sem ligadura e sem alterações. E) lado direito mostrando inflamação intensa, com mudança de cor, edema e sangramento após sondagem. C) e F) análise clínica do grupo periodontite com duas ligaduras. C) mostrando o lado esquerdo com inflamação, edema, mudança de cor, sem sangramento. F) lado direito mostrando inflamação intensa, edema e sangramento após uma pequena sondagem. G) Gráfico de ISG mostrando valores elevados para grupos com periodontite quando comparados com o grupo controle. A comparação entre os grupos com ligadura não apresentou mudanças significativas. H) Gráfico de PS mostrando aumento para os grupos com periodontite em relação ao grupo controle. Não há alterações significativas entre grupos com ligadura. I), J) e K) representam a diferença clínica do osso alveolar. I) no controle, sem alteração. J) e k) grupos com uma ligadura e com duas ligaduras apresentando perda óssea alveolar. L) POA, demonstrando a diferença significativa dos grupos com periodontite em comparação com o controle. Os grupos com ligadura não apresentaram mudanças significativas

quando comparados entre si. M) Representa a mobilidade dentária, há diferença significativa dos grupos com ligadura em relação ao controle. Não foram demonstradas alterações significativas entre os grupos induzidos. E.P.M. * $p < 0,05$ representa grupos com periodontite versus grupo controle.

Figura 2. A) Representa a atividade de MPO no tecido gengival. Os grupos com periodontite apresentaram altos níveis de atividade MPO quando comparados ao grupo controle. No entanto, a análise entre grupos com ligadura não revelou alterações significativas. B) Análise dos níveis de MDA no tecido gengival, a avaliação dos grupos com periodontite mostrou níveis elevados em relação ao grupo controle, e a análise entre os grupos com indução não apresentou alterações significativas. E.P.M* $p < 0,05$ representa grupos de periodontite versus grupo de controle.

Figura 3. A) D) e G) Representam o tecido hepático do grupo controle sem alterações histológicas. Ao redor da veia central encontram-se hepatócitos em conformação normal. B), E) e H) Representam o tecido hepático do grupo com uma ligadura demonstrando vários hepatócitos com perda da conformação, apresentando esteatose. C), F) e I) Representam o tecido hepático do grupo periodontite com duas ligaduras. Os hepatócitos exibem conformação em cordões alterada e presença de esteatose. A proporção de hepatócitos degenerados no grupo com duas ligaduras apresentou-se inferior ao observado no grupo com uma ligadura. A), B) e C) Hematoxilina e eosina, D), E) e F) azul de toluidina, G), H) e I) ácido Periódico de Schiff (PAS). Ampliação original 150x.

Figura 4. A) Representa a análise da esteatose no tecido hepático. Ambos os grupos com periodontite demonstraram um aumento significativo da esteatose quando comparados ao grupo controle, no entanto os grupos com ligadura não apresentaram diferenças significativas entre si. B) Representa os níveis de inflamação, C) representa a densidade dos mastócitos, D) representa a necrose e E) os níveis de atividade de MPO no tecido hepático. Os parâmetros B), C), D) e E) não apresentaram alterações significativas entre os grupos estudados. E.P.M* $p < 0,05$ representa grupos de periodontite versus grupo de controle.

Figura 5. A) Representa os níveis de GSH no fígado. O grupo controle apresentou uma concentração significativamente maior em relação aos grupos com periodontite. Os grupos com periodontite não apresentaram alterações

significativas entre si. B) as concentrações de MDA no tecido hepático. Os grupos com periodontite demonstraram diferenças significantes em relação ao grupo controle, mas não mostraram alterações entre si. Os níveis de colesterol (C) e de triglicérides (D) apresentaram-se aumentados nos grupos induzidos em comparação com o grupo controle, contudo a comparação entre eles não demonstrou mudanças significativas. E.P.M * $p < 0,05$ representa grupos de periodontite versus grupo controle.

Figura 1

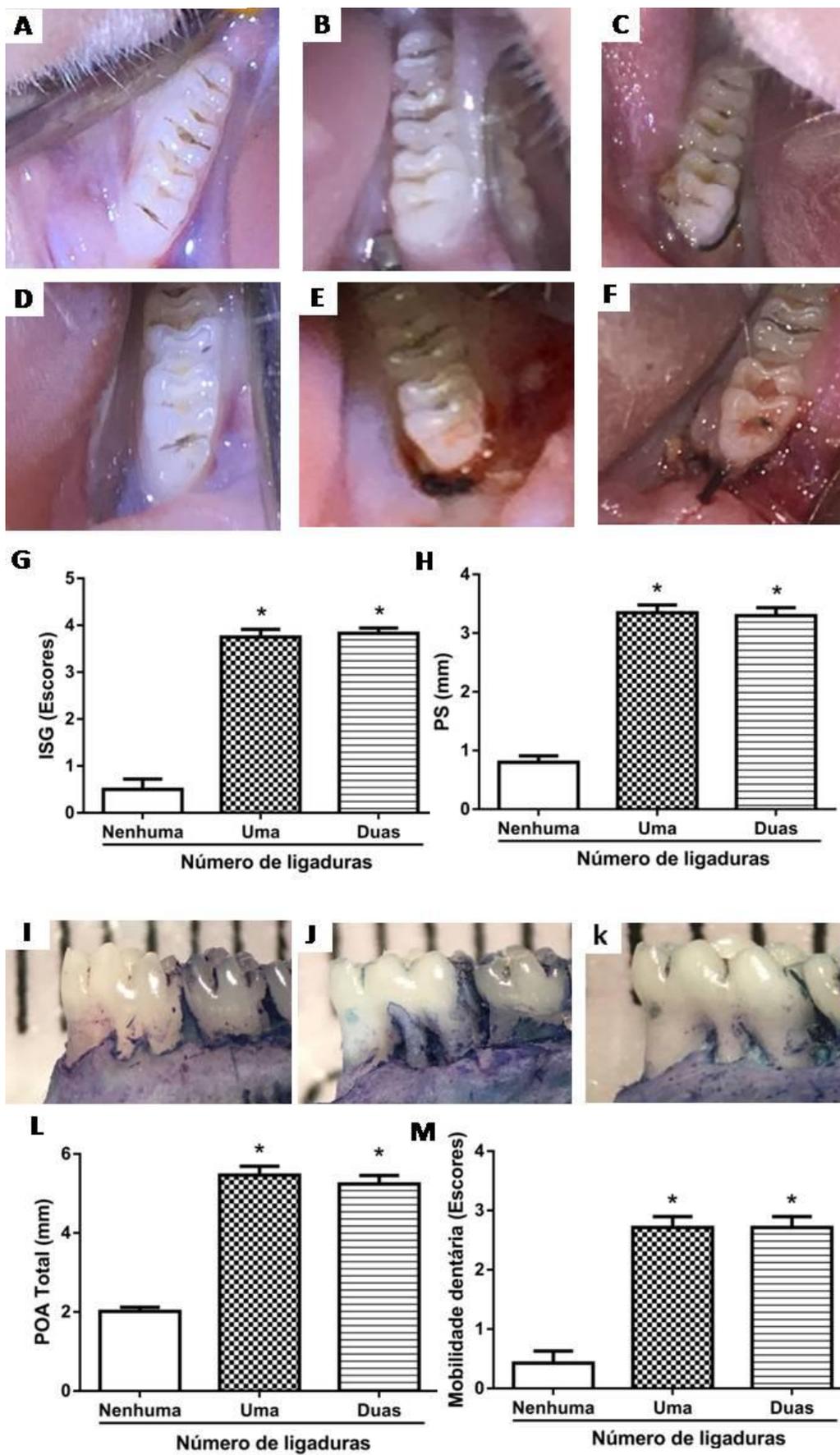


Figura 2

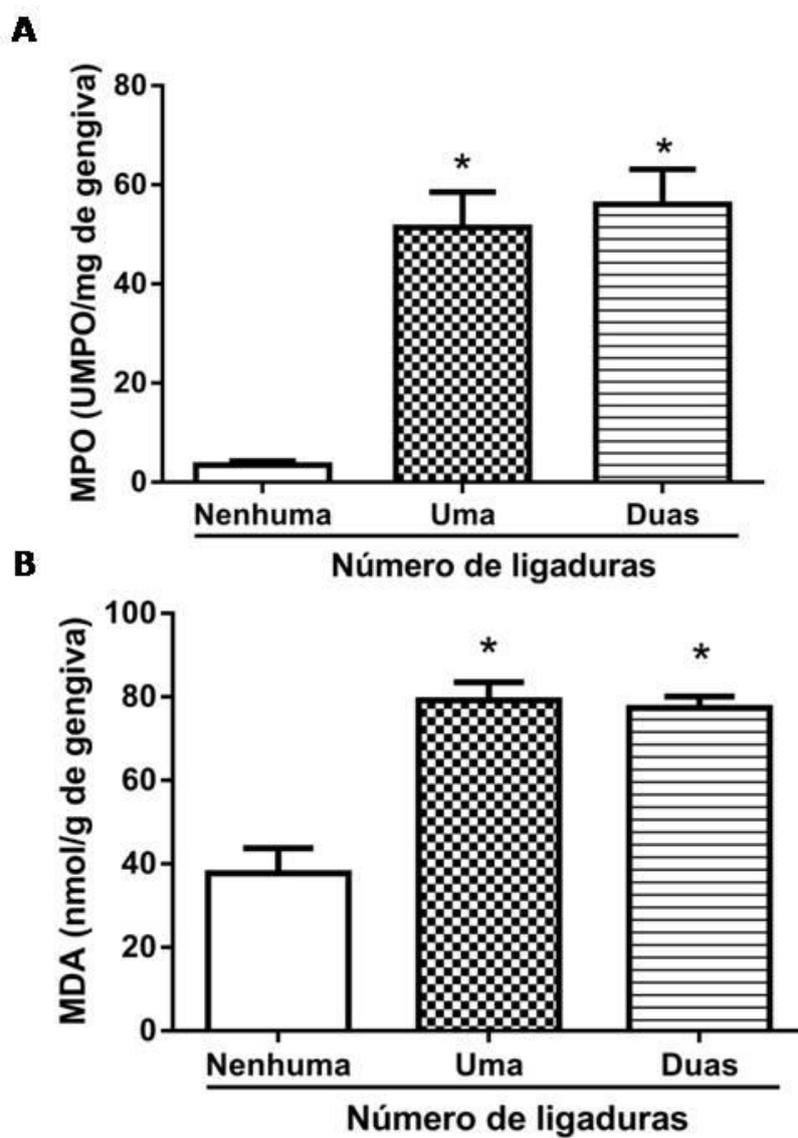


Figura 3

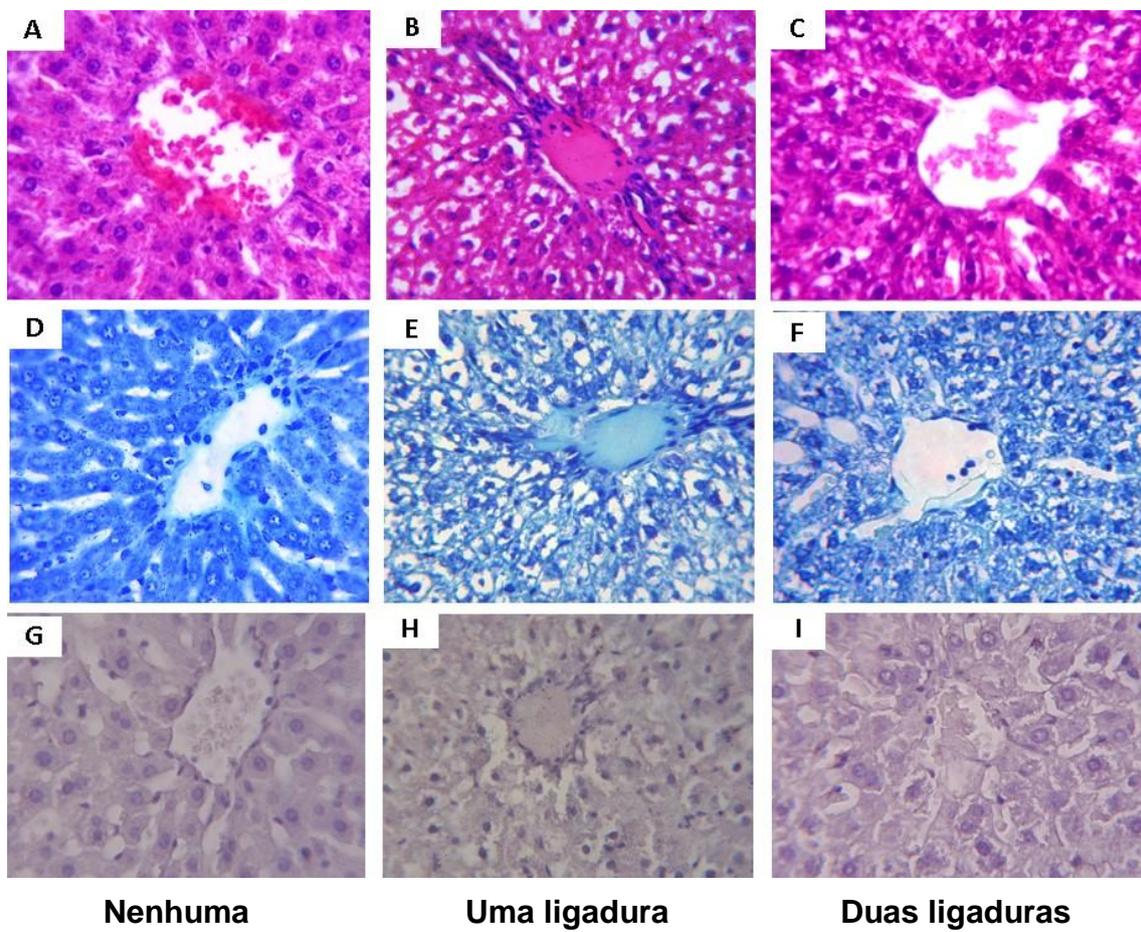


Figura 4

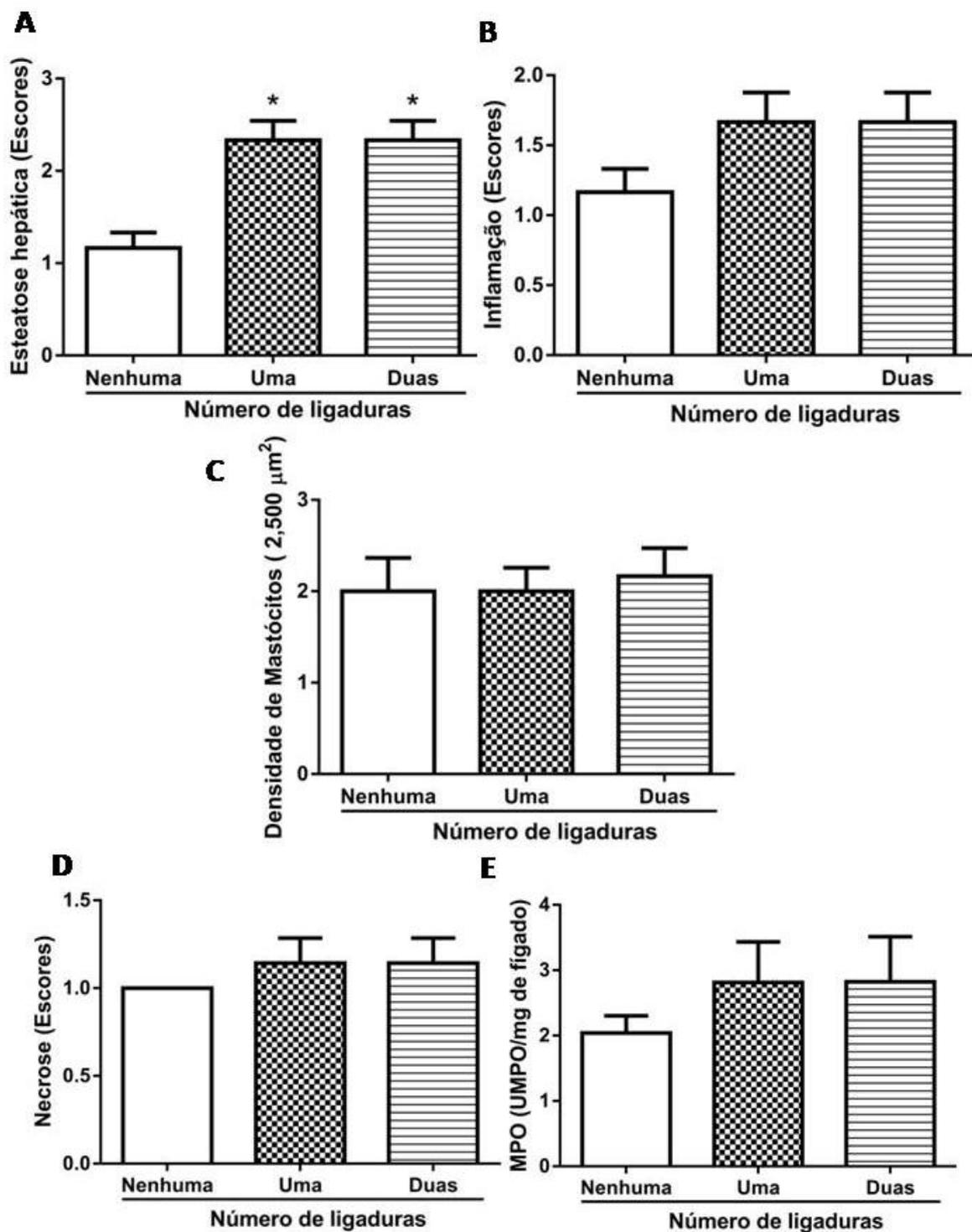


Figura 5

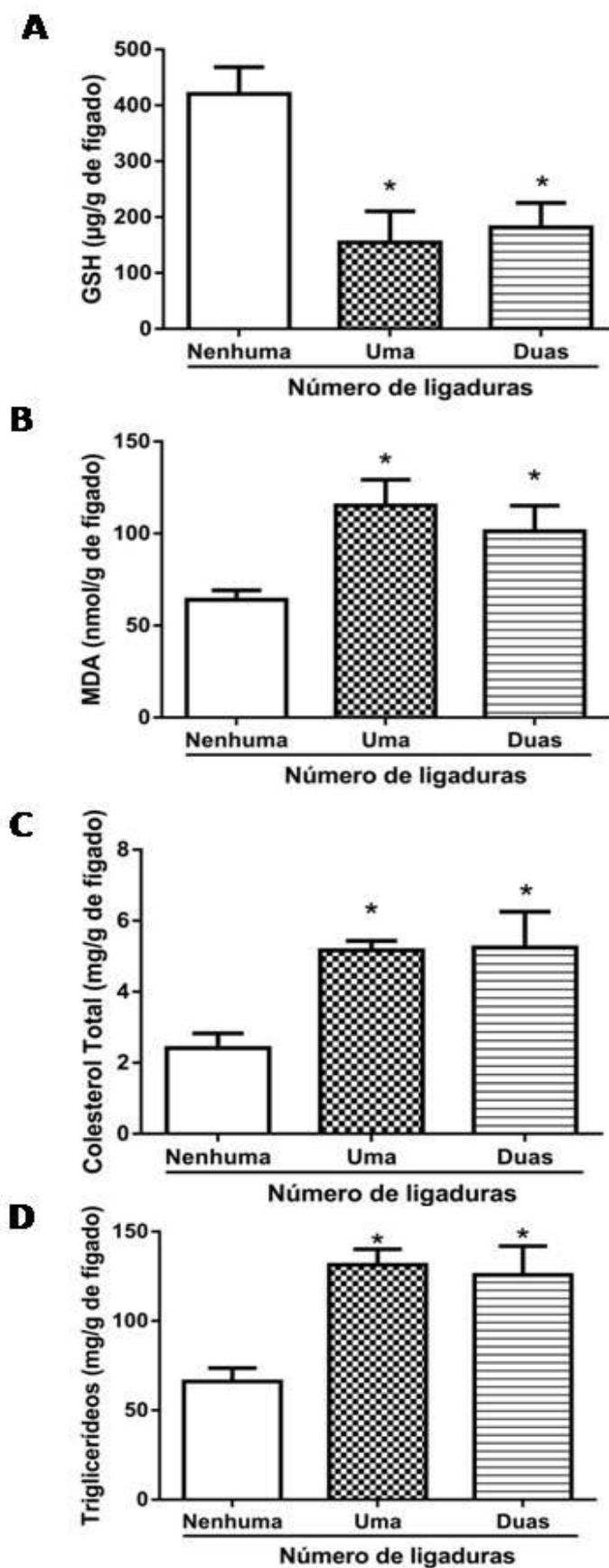


Tabela 1. Peso corporal, do fígado e dosagens bioquímicas do soro

Grupos	Nenhuma	Uma	Duas
Parâmetros de peso			
Fígado(g)	7,2 ± 0,2	7,4 ± 0,1	7,0 ± 0,2
Peso corporal(g)	186, 5 ± 7,0	178,9 ±10,0	200,5 ± 3,6
Parâmetros bioquímicos			
AST (U/L)	53,6 ± 5,1	55,7 ± 12,7	62,7 ± 4,9
ALT (U/L)	29,8 ± 2,1	30,3 ± 3,0	31,4 ± 3,5

O peso corporal e do fígado dos animais. A comparação entre o grupo controle e os grupos com uma e duas ligaduras não apresentou diferença significativa em relação ao peso corporal e dos órgãos. O grupo com duas ligaduras apresentou a maior média de peso corporal entre os grupos analisados. Os parâmetros bioquímicos (AST e ALT) não indicaram alterações significativas entre os grupos do estudo ($p > 0,05$). Média das proporções individuais e \pm E.P.M.

4 CAPÍTULO III

4.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo foi possível observar que os danos hepáticos decorrentes da periodontite induzida por ligadura em ratos não apresentam extensão e severidade associadas com o aumento no número de sítios de danos periodontais. Em virtude disto, ressalta-se que a utilização de apenas uma ligadura em modelos de indução de periodontite é suficiente para desencadear lesões hepáticas como a esteatose.

4.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKRAM, Z. et al. Cytokine profile in chronic periodontitis patients with and without obesity: a systematic review and meta-analysis. **Disease Markers**, v. 2016, 2016.

ALMEIDA, R. F. et al. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**, v. 22, n. 3, p. 379-90, 2006.

ALOIA, T. P. A. **Efeitos de fatores hepatotróficos no fígado em ratos Wistar (Rattus norvegicus)**. 2006. Tese (Doutorado em Anatomia dos animais domésticos e silvestres) - Universidade de São Paulo.

AMAYA, M. P. et al. Polymorphisms of pro-inflammatory cytokine genes and the risk for acute suppurative or chronic nonsuppurative apical periodontitis in a Colombian population. **International endodontic journal**, v. 46, n. 1, p. 71-78, 2013.

ANTONINI, R. et al. Fisiopatologia da doença periodontal. **Revista Inova Saúde**, vol. 2, n. 2, 2013.

ANDRADE, T. A. M. **Modificações teciduais e mecanismos de ação da fração F1 do látex da seringueira Hevea brasiliensis na cicatrização de úlceras cutâneas em ratos diabéticos**. 2012. Tese (Doutorado em ciências médicas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

BALBINO, R.R. et al. **Doença Periodontal na Gravidez**. 2015. Dissertação (Mestrado integrado em medicina dentaria) – Instituto Superior de ciências da saúde, Egas Moniz.

BARTOLD, P. M.; NARAYANAN, A. S. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. **Periodontology 2000**, v. 40, p. 29-49, 2006.

BASCONES-MARTÍNEZ, A. et al. Host defence mechanisms against bacterial aggression in periodontal disease: Basic mechanisms. **Medina Oral, Patologia Oral y Cirurgia Bucal**, v. 14, n. 12, p. e680-5, 2009.

BASSANI, L. **Perfil lipídico de pacientes cirróticos e sua correlação com os escores prognósticos**. 2011. Dissertação (Mestrado em hepatologia) – Universidade de ciências da saúde, Porto Alegre.

BECHMANN, L.P. et al. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. **Journal of hepatology**, v. 56, p. 952-964, 2012.

BELLENTANI, S. et al. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. **Digestive diseases**, v. 28, n. 1, p. 155-161, 2010.

BELLENTANI, S.; MARINO, M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Annals Hepatology**, v. 8, n. 1, p. S4-S8, 2009.

BEREZOW, A. B.; DARVEAU, R. P. Microbial shift and periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 55, n. 1, p. 36-47, 2011.

BORGES JR, I. et al. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. **Mediators of inflammation**, v. 2007, 2007.

CHALASANI, M. D. N. et al. The Diagnosis and Management of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 67, n. 1, p. 328-357, 2017.

CHAVES, L. S. et al. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 35, n. 1, p. 93-100, 2013.

CHEN, Y. et al. Hepatocyte-specific Gclc deletion leads to rapid onset of steatosis with mitochondrial injury and liver failure. **Hepatology**, v. 45, n. 5, p. 1118-1128, 2007.

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **Journal of periodontology**, v. 79, n. 8S, p. 1569-1576, 2008.

COELHO, L. F. **Análise morfológica do fígado e baço de camundongos Balb/c submetidos à desnutrição protéico-calórica e infectados com Leishmania infantum**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade federal de ouro preto.

CONSOLARO, A.; FRANSCISCHONE, T. R. G.; FURQUIM, L. Z. As reabsorções radiculares múltiplas ou severas não estão relacionadas a fatores sistêmicos, suscetibilidade individual, tendência familiar e predisposição individual. Dental Press **Journal of Orthodontics**, v. 16, n. 1, p. 17-21, 2011.

CORTELLI, J. R.; CORTELLI, S.C. Periodontite crônica e agressiva: prevalência subgingival e frequência de ocorrência de patógenos periodontais. **Revista Biociências**, v. 9, n. 2, 2008.

COTRIM, Helma P. et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. **Annals Hepatology**, v. 10, n. 1, p. 33-7, 2011.

DA SILVA, F.R.P. et al. Relationship between -889 C/T polymorphism in interleukin-1 A gene and risk of chronic periodontitis: evidence from a meta-analysis with new published findings. **Medicina oral, patologia oral y cirurgia oral**, p.0, 2016.

DARVEAU, R. P. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 481-490, 2010.

DE ALWIS, N. M. W.; DAY, C. P. Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. **Journal of hepatology**, v. 48, p. S104-S112, 2008.

DE LACUEVA FRANÇA, M. AI. **Estudo da influência da geometria na transmissão de tensões ao osso no desenvolvimento da periimplantite**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

DÍAZ-ZÚÑIGA, J. et al. Increased levels of the T-helper 22-associated cytokine (interleukin-22) and transcription factor (aryl hydrocarbon receptor) in patients with periodontitis are associated with osteoclast resorptive activity and severity of the disease. **Journal of Periodontal Research**, 2017.

DOWMAN, J. K.; TOMLINSON, J. W.; NEWSOME, P. N. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 103, n. 2, p. 71-83, 2009.

DUARTE, A. R. B. **Avaliação do fígado num modelo de toxicologia experimental com DMBA**. 2014. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental). Faculdade de Medicina - Universidade de Coimbra.

EDER, R. **O exercício intermitente modula o metabolismo lipídico em ratos: o fígado como órgão gerenciador**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo, São Paulo.

FERREIRA, A. L. A. et al. Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto do estresse oxidativo na patogênese. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 1, p. 54-61, 2011.

FIGUEIREDO, V. P. **A infecção experimental pelo Trypanosoma cruzi agrava o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas em camundongos apoE^{-/-}**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais.

FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **Jornal Português de gastroenterologia**, v. 20, n. 5, p 199-206, 2013.

FLORES, M. G. et al. Cementum–periodontal ligament complex regeneration using the cell sheet technique. **Journal of periodontal research**, v. 43, n. 3, p. 364-371, 2008.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

GOUVEIA, A. I. E. A. **Doença periodontal no cão**. (2009). Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Técnica de Lisboa.

GRØNKJÆR, L.L. Periodontal disease and liver cirrhosis: A systematic review. **SAGE open medicine**, v. 3, 2015.

GUIMARÃES, M. V. et al. Dry Extract of *Matricaria recutita* L.(Chamomile) Prevents Ligature-Induced Alveolar Bone Resorption in Rats via Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β . **Journal of periodontology**, v. 87, n. 6, p. 706-715, 2016.

HAN, P.; SUN, D.; YANG, J. Interaction between periodontitis and liver diseases (Review). **Biomedical Reports**, v. 5, n. 3, p. 267-276, 2016.

HELLER, D. et al. Impact of systemic antimicrobials combined with anti-infective mechanical debridement on the microbiota of generalized aggressive periodontitis: a 6-month RCT. **Journal of clinical periodontology**, v. 38, n. 4, p. 355-364, 2011.

HO, S. P. et al. The biomechanical characteristics of the bone-periodontal ligament-cementum complex. **Biomaterials**, v. 31, n. 25, p. 6635-6646, 2010.

HO, S. P. et al. The tooth attachment mechanism defined by structure, chemical composition and mechanical properties of collagen fibers in the periodontium. **Biomaterials**, v. 28, n. 35, p. 5238-5245, 2007.

ISHIKAWA, M. et al. Oral Porphyromonas gingivalis translocates to the liver and regulates hepatic glycogen synthesis through the Akt/GSK-3 β signaling pathway. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 12, p. 2035-2043, 2013.

KNIGHT, E. T. et al. Risk factors that may modify the innate and adaptive immune responses in periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 71, n. 1, p. 22-51, 2016.

KRAWCZYK, M.; BONFRATE, L.; PORTINCASA, P. Nonalcoholic fatty liver disease. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 5, p. 695-708, 2010.

LANG, N. P.; SCHÄTZLE, M. A.; LÖE, H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 36, n. s10, p. 3-8, 2009.

LAPPIN, D. F. et al. Influence of periodontal disease, Porphyromonas gingivalis and cigarette smoking on systemic anti-citrullinated peptide antibody titres. **Journal of clinical periodontology**, v. 40, n. 10, p. 907-915, 2013.

LEMOIS, A. F. P. **O papel da Porphyromonas gingivalis nas doenças da cavidade oral e sua relação com doenças sistémicas**. 2016. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Dentária)- Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Almada, Portugal.

LÉRIAS, S.M. L. **Suscetibilidade genética às doenças orais de etiologia microbiana**. 2016. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Dentária)- Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Almada, Portugal.

LI, L. et al. Increased susceptibility of MER5 (peroxiredoxin III) knockout mice to LPS-induced oxidative stress. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 355, n. 3, p. 715-721, 2007.

LINDHE, J.; KARRING, T.; ARAÚJO, M. The anatomy of periodontal tissues. **Clinical periodontology and implant dentistry**, v. 5, p. 27-31, 2008.

LIU, R. et al. Effects of systemic ornidazole, systemic and local compound ornidazole and pefloxacin mesylate on experimental periodontitis in rats. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 18, n. 3, p. BR95, 2012.

MACEDO, F. R. et al. Associação entre periodontite e doença pulmonar. **RGO. Revista Gaúcha de Odontologia (Online)**, v. 58, n. 1, p. 47-53, 2010

MAGGIONI, L. S. **A lipoperoxidação plasmática como preditor de esteatohepatite não alcoólica em obesos mórbidos com doença hepática gordurosa não alcoólica**. 2014. Tese (Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde) - Universidade Católica.

MARQUES K.R.S et al. Doença periodontal e asma: revisão da literatura. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.10, n.3, p.263-269, 2011.

MARTELLI, A. Metabolismo Hepatocelular dos Lipídeos: uma Abordagem Clínica e Histopatológica do Acúmulo Intracelular de Lípidos (Esteatose) do Parênquima Hepático Induzida pelo Álcool. **Journal of Health Sciences**, v. 12, n. 1, 2015.

MASI, S. et al. Oxidative stress, chronic inflammation, and telomere length in patients with periodontitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 6, p. 730-735, 2011.

MATSUDA, Y. et al. Ligature-induced periodontitis in mice induces elevated levels of circulating interleukin-6 but shows only weak effects on adipose and liver tissues. **Journal of periodontal research**, 2015

MINEOKA, T. et al. Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia in subgingival plaque. **Journal of periodontology**, v. 79, n. 4, p. 670-676, 2008.

MISTRY, A. et al. Effect of Combined Therapy Using Diode Laser and Photodynamic Therapy on Levels of IL-17 in Gingival Crevicular Fluid in Patients With Chronic Periodontitis. **Journal of lasers in medical sciences**, v. 7, n. 4, p. 250, 2016.

MORITA, T. et al. Serum γ -glutamyltransferase level is associated with periodontal disease independent of drinking habits in Japanese adults. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 20, p. 2109, 2014.

MONTERO, E. et al. Clinical and microbiological effects of the adjunctive use of probiotics in the treatment of gingivitis: a randomized controlled clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, 2017.

MUDALIAR, S. et al. Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 145, n. 3, p. 574-582. e1, 2013.

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Progress in lipid research**, v. 48, n. 1, p. 1-26, 2009.

MUNZ, M. et al. A genome-wide association study identifies nucleotide variants at SIGLEC5 and DEFA1A3 as risk loci for periodontitis. **Human Molecular Genetics**, 2017.

NAGAO, Y.; KAWAHIGASHI, Y.; SATA, M. Association of periodontal diseases and liver fibrosis in patients with HCV and/or HBV infection. **Hepatitis monthly**, v. 14, n. 12, 2014.

PALUMBO, A. The anatomy and physiology of the healthy periodontium. In: **Gingival Diseases-Their Aetiology, Prevention and Treatment**. Intech, 2011.

PHAM, T. A.V. et al. Risk factors of periodontal disease in Vietnamese patients. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, 2017.

PIERI, N. C. et al. Classificação morfofuncional dos dentes de quati, *Nasua nasua*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 447-451, 2011.

PINTO, C. G. S. et al. Esteatose Hepática e Estilo de Vida Ativo: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 20, n. 3, p. 125-134, 2012.

PONTES ANDERSEN, C. C.; HOLMSTRUP, P.; BUSCHARD, K.; FLYVBJERG, A. Renal alterations in prediabetic rats with periodontitis. **Journal of periodontology**, v. 79, n. 4, p. 684-690, 2008.

RABELO, F. **Marcadores inflamatórios sistêmicos em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)**. 2010. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

RAKIAN, A. et al. Bone morphogenetic protein-2 gene controls tooth root development in coordination with formation of the periodontium. **International journal of oral science**, v. 5, n. 2, p. 75-84, 2013..

RAMALHO, I. M. A. C. A. **Contributo dos marcadores de síntese e de absorção do colesterol na terapêutica hipocolesterolemizante**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal.

RAMS, T. E.; DEGENER, J. E.; VAN WINKELHOFF, A. J. Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. **Journal of periodontology**, v. 85, n. 1, p. 160-169, 2014.

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA, J. F. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 11, p. 3599-3606, 2008.

RODINI, C. O. **Doença periodontal inflamatória induzida por ligadura: caracterização microscópica e estudo da presença de mastócitos e das enzimas óxido nítrico sintase induzível (inos) e metaloproteinases-2 e-9**. 2005. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru, São Paulo.

RODRIGUES, M. A. H. **Avaliação dos marcadores clínicos e inflamatórios da doença hepática gordurosa não alcoólica em mulheres na pós-menopausa com síndrome metabólica**. 2013. Tese (Doutorado em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo.

RODRIGUES, G. R. **Ação da sinvastatina no modelo experimental de esteato-hepatite não alcoólica**. 2014. Tese (Doutorado em Medicina) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

ROLO, A. P.; TEODORO, J. S.; PALMEIRA, C. M. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 59-69, 2012.

ROMAN, R. M.; WENDLAND, A. E.; POLANCZYK, C. A. Myeloperoxidase and coronary arterial disease: from research to clinical practice. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 91, n. 1, p. e12-e19, 2008.

ROOKER, S. M.; LIU, B.; HELMS, J. A. Role of Wnt signaling in the biology of the periodontium. **Developmental Dynamics**, v. 239, n. 1, p. 140-147, 2010.

SANTOS, E.O.L. **Mecanismos de ação de flavonoides no metabolismo oxidativo e na fagocitose de neutrófilos humanos desencadeados por receptores Fc-gama e CR**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) - Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

SANTOS-SILVA, et al. The Oxidative Response of Mouse Hearts is Modulated by Genetic Background. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.100, n.2, 2013.

SOCRANSKY, S.S et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal Clinical Periodontology**, v.25, p.134-144, 1998.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SEIXAS, R. B. P. M. **Avaliação da esteatose hepática em crianças e adolescentes obesos e com sobrepeso e sua associação com a resistência à insulina**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília.

SILVA, A. H. **Efeitos da acupuntura e da eletroacupuntura sobre o estresse oxidativo em ratos saudáveis**. 2009. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SILVA, M.C. **Estudos retrospectivos de lesões hepáticas crônicas em cães**. 2005. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Catarina, Rio Grande do Sul.

SODEK, J.; MCKEE, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology 2000**, v. 24, p. 99-126, 2000.

SOLER, G.L.N. et al. Doença hepática gordurosa não-alcoólica: associação com síndrome metabólica e fatores de risco cardiovascular. **Revista Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**, v. 21, n. 2, p. 94-100, 2008.

SONG, I. S. et al. Severe Periodontitis Is Associated with Insulin Resistance in Non-abdominal Obese Adults. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 101, n. 11, p. 4251-4259, 2016.

SOUSA, Al. V. **Prevalência e fatores associados à doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) na comunidade Madureira de Pinho localizada em Salvador-Ba**. 2012. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Saúde) - Universidade Federal da Bahia, Salvador.

SOUZA, D. M. et al. Avaliação óssea alveolar de *rattus norvegicus* por meio dos métodos radiográfico e morfométrico. **Brazilian Dental Science**, v.8, n.4, p. 77-84, 2005.

SOUZA, L. M. et al. Effect of maternal periodontitis and low birth weight—A case control study. **Acta odontologica Scandinavica**, v. 74, n. 1, p. 73-80, 2015.

SOUZA, R. O. **Densidade de mastócitos e microdensidade vascular em displasias epiteliais e carcinomas orais**. 2012. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Salvador, Bahia.

TAKANO, M. et al. Hepatocytes produce tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in response to *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of periodontal research**, v. 47, n. 1, p. 89-94, 2012.

TAYLOR, G. W.; BORGNAKKE, W. S. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. **Oral diseases**, v. 14, n. 3, p. 191-203, 2008.

TELES, R. et al. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. **Journal of periodontology**, v. 81, n. 1, p. 89-98, 2010.

TEIXEIRA, J.; PINHO, M. M. Associação entre periodontite e acidente vascular cerebral (AVC). **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**, v. 52, n. 2, p. 115-121, 2011.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1836-1846, 2010.

TOMOFUJI, T. et al. Chronic administration of lipopolysaccharide and proteases induces periodontal inflammation and hepatic steatosis in rats. **Journal of periodontology**, v. 78, n. 10, p. 1999-2006, 2007.

TOMOFUJI, T. et al. Oxidative damage of rat liver induced by ligature-induced periodontitis and chronic ethanol consumption. **Archives of oral biology**, v. 53, n. 12, p. 1113-1118, 2008.

TOMOFUJI, T. et al. Effects of improvement in periodontal inflammation by toothbrushing on serum lipopolysaccharide concentration and liver injury in rats. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 67, n. 4, p. 200-205, 2009.

TONETTI, M. S. et al. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. **Journal of Clinical Periodontology**, 2017.

TURLIN, B. et al. Assessment of hepatic steatosis: comparison of quantitative and semiquantitative methods in 108 liver biopsies. **Liver International**, v. 29, n. 4, p. 530-535, 2009.

VASCONCELOS, D. F. P. et al. Intermittent parathyroid hormone administration improves periodontal healing in rats. **Journal of Periodontology**, v. 85, p. 721-728, 2014.

UCHIYAMA, M; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 271-278, 1978.

VASCONCELOS, D. F. P. et al. Decrease of Pericytes is Associated With Ligature-Induced Periodontitis Liver Disease in Rats. **Journal of Periodontology**, n. 0, p. 1-14, 2017.

VASCONCELOS, R. C. et al. Immunoexpression of HIF-1 α and VEGF in periodontal disease and healthy gingival tissues. **Brazilian dental journal**, v. 27, n. 2, p. 117-122, 2016.

VIEIRA, B. M. **Padronização de dose de tetracloreto de carbono em modelo de lesão hepática aguda por estresse oxidativo em ratos Wistar**. 2014. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde)- Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

VITORINO, J. T. L. **Doenças periodontais e sua relação com patologia sistêmica e farmacoterapia associada**. 2015. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Dentária)- Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Almada, Portugal.

VU, L. T. et al. The hepatocyte proteome in organotypic rat liver models and the influence of the local microenvironment. **Proteome Science**, v. 15, n. 1, p. 12, 2017.

WOLF, H. F.; RATEISCHAK-PLUSS, E. M.; RAITEITSCHAK, K. H. (2006). *Atlas Coloridos de Odontologia - Periodontia* (3ª ed.). Porto Alegre: Artmed.

XU, Y.; WEI, W. A comparative study of systemic subantimicrobial and topical treatment of minocycline in experimental periodontitis of rats. **Archives of oral biology**, v. 51, n. 9, p. 794-803, 2006.

YAMAMOTO, T. et al. Effects of topical application of lipopolysaccharide and proteases on hepatic injury induced by high-cholesterol diet in rats. **Journal of periodontal research**, v. 45, n. 1, p. 129-135, 2010.

YANG, D. et al. Involvement of CD147 in alveolar bone remodeling and soft tissue degradation in experimental periodontitis. **Journal of periodontal research**, v.52, n.4, p. 704-712, 2017.

YONEDA, M. et al. Involvement of a periodontal pathogen, Porphyromonas gingivalis on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **BMC gastroenterology**, v. 12, n. 1, p. 1, 2012.

ZORRO, A. F.C. **Importância da consulta de rotina no rastreio de doença periodontal e doenças oftalmológicas, em cães**. 2014. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa.

ANEXO A

Carta de aprovação do comitê de ética



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil. CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceepi@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Avaliação do Potencial reparador de plantas e algas encontradas no Nordeste do Brasil sobre os tecidos periodontais**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. **DANIEL FERNANDO PEREIRA VASCONCELOS**, com Carta de Aprovação deste Comitê sob o nº **061/14**, teve a solicitação de Prorrogação de Período de Vigência de Novembro/2016 à Novembro/2017, **Aprovada por este Comitê.**

Teresina, 04 de Novembro de 2016.


Prof.^a Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora

ANEXO B

Carta de aceite da revista

MedOral_Ref.22204_Date. 2018-01-25_Accept

Entrada x

medoral.es
para mim

25 de jan



inglês



português

Traduzir mensagem

Desativar para: inglês

Med Oral Patol Oral Cir Bucal

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2016: 63/90 (Q3) (Dentistry, Oral Surgery & Medicine) JCR Impact Factor: 1.156

2018-01-25

Reference: 22204

Title: One or two ligatures inducing periodontitis are sufficient to cause fatty liver

Dr. Daniel Vasconcelos

Email: vasconcelos@ufpi.edu.br

Password: [REDACTED]

www.medoral.es

Dear Dr,

Thank you for submitting your article for our consideration.

Your above referenced article with the following authors: Larissa Pessoa, Felipe Silva, Even Alves, Luiz França, David Lenardo, Joaquina Carvalho, Victor Martins, Francisca Sousa, Karina Drumond, Jand-Venes Medeiros, Jefferson Oliveira, Daniel Vasconcelos, has been evaluated by the reviewers. We are happy to inform you that they have recommended accepting the manuscript for publication in *Medicina Oral Patologia Oral Cirurgia Bucal*.

We follow acceptance by date-order to establish the final publication of a manuscript.

Please complete the Copyright Transfer Agreement form available at <http://www.medicinaoral.com/copyright.htm> and the CONFLICT OF INTEREST requirement available