



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

LUIZ FELIPE DE CARVALHO FRANÇA

**ESTUDO BIOQUÍMICO E HISTOMORFOMÉTRICO DOS EFEITOS RENAIIS
DA PERIODONTITE INDUZIDA EM RATOS**

PARNAÍBA – PI

2018

LUIZ FELIPE DE CARVALHO FRANÇA

**ESTUDO BIOQUÍMICO E HISTOMORFOMÉTRICO DOS EFEITOS RENAIIS
DA PERIODONTITE INDUZIDA EM RATOS**

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

Área de concentração: Medicina investigativa e marcadores epidemiológicos.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos

PARNAÍBA – PI

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba

Serviço de Processamento Técnico

F814e França, Luiz Felipe de Carvalho.

Estudo bioquímico e histomorfométrico dos efeitos renais da periodontite induzida em ratos [manuscrito] / Luiz Felipe de Carvalho França. – 2018.

64 f.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos.

1. Doença Periodontal. 2. Periodontite. 3. Inflamação. 4. Estresse Oxidativo. I. Título.

CDD: 617.632

LUIZ FELIPE DE CARVALHO FRANÇA

**ESTUDO BIOQUÍMICO E HISTOMORFOMÉTRICO DOS EFEITOS RENAIIS
DA PERIODONTITE INDUZIDA EM RATOS**

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

APROVADA EM 27/09/2018

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos
Universidade Federal do Piauí
Departamento de Biomedicina
(Presidente e orientador)

Dr. Manoel Dias de Souza Filho
Universidade Federal do Piauí
Departamento de Biomedicina
(Examinador Externo ao programa)

Dr. Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar
Universidade Federal do Piauí
(Examinador externo ao programa)

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima”

Louis Pasteur.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por todas as graças derramadas sobre minha família e as que ainda estão por vir. Devo tudo a ele por existir tantas pessoas maravilhosas em minha vida.

Ao meu irmão Francisco Antônio de Carvalho França, pela união, força e batalhas que passamos diariamente, somente nós sabemos como foi difícil chegar até aqui, tenho certeza que sem você não teria conseguido.

À minha nova família, minha cunhada Vanessa Carvalho da Silva França pelos momentos descontraídos durante nossa convivência e apoio durante essa longa caminhada e meu sobrinho, Dante Carvalho da Silva França.

À minha segunda família, Maria da conceição Carvalho Freitas, por me acolher durante todos esses anos, orientando e guiando com seus conselhos preciosos e experiência de vida.

Minhas primas Maria dos Anjos Carvalho Costa e Conceição de Maria Carvalho Malveira, por serem minhas irmãs que nunca tive, mostrando sempre o real significado de uma família, que mesmo diante das adversidades, sempre temos uns aos outros.

Aos meus tios, Paulo Henrique Malveira e Jose maria Costa, por todos os momentos e ensinamentos, sempre sendo exemplos de responsabilidade e minha tia Maria das Graças Carvalho França, por me mostrar como ser uma pessoa batalhadora e que sempre com perseverança podemos conquistar nossos objetivos.

Às minhas “priminhas” Maria Clara Carvalho Malveira e Júlia Carvalho Costa, que me inspiraram a ser uma pessoa melhor, visto que somos exemplos para as crianças que crescem ao nosso redor.

A minha namorada Isis Pires Pereira que esteve em todos os momentos ao meu lado, me incentivando e apoiando em cada decisão, além de ser amiga, companheira e confidente.

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos, agradeço pelo voto de confiança e oportunidade de fazer parte da equipe laboratorial, acolhendo me durante minha jornada acadêmica na pesquisa científica, possibilitando agregar conhecimento, além de ser um grande profissional.

À equipe do Laboratório de Análise e Processamento Histológico (LAPHIS), Felipe Rodolfo Pereira da Silva, David di Lenardo, Even Herlany Pereira Alves, Joaquina dos Santos Carvalho, Larissa dos Santos Pessoa, Maria Luísa Lima Barreto do Nascimento, Victor Brito Dantas Martins, Luana Silva Rodrigues, Bruno Almeida Arrais, André dos Santos Carvalho, Antônio de Pádua Rocha Nóbrega Neto, Pedro Henrique Sales de Oliveira, Hélio Mateus Silva Nascimento, Raissa Silva Bacelar de Andrade, Ayane Araújo Rodrigues, Juliana Gomes Galeno, Alan Leandro Carvalho de Farias e Victor Lucas Ribeiro Lopes, por toda ajuda não só durante os experimentos, mas por todos os momentos que passamos de alegria e descontração, considero todos grandes amigos.

Aos meus amigos de graduação Lucas Eduardo Silva Oliveira, Francisco Danilo da Silva, Tiago Almeida Peixoto, Felipe Rodolfo Pereira da Silva, Antônio Carlos Silva e Maélson Klever da Silva, pela amizade que fizeram quatro anos e meio de curso bem mais tranquilos.

Aos meus amigos que encontrei ao longo da vida Acadêmica, Lucas Arruda Moita, Vanessa Galeno de Souza, Kelly Raphysa que sempre contribuíram com risadas, conselhos e inúmeras xícaras de café.

Às parcerias formadas juntamente ao laboratório de Fisiopharmacologia experimental coordenado pelo prof Dr. Jand Venes Rolim Medeiros e seus alunos que sempre estavam de prontidão para auxiliar na pesquisa, tornando

possível a realização do trabalho, em especial a Luan Kelves Miranda de Souza que prontificou-se participando ativamente na pesquisa.

À universidade federal do piauí, ao programa de pós-graduação em ciências biomédicas e ao conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico - CNPQ pelo apoio, permitindo que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

A periodontite é uma doença crônica-inflamatória, que leva a destruição progressiva dos tecidos de suporte e proteção dentário em resposta a presença de biofilme na região periodontal. A intensa resposta inflamatória resulta em efeitos sistêmicos nocivos, sendo associados principalmente ao aumento de espécies reativas de oxigênio, levando a alterações hepáticas, endoteliais e cardiovasculares. No entanto, a periodontite vem sendo estudada como um dos fatores de risco para o aparecimento de doenças renais, contudo, os mecanismos dessa relação ainda permanecem incertos. Acredita-se que modificações em marcadores de estresse oxidativo e peroxidação lipídica sejam responsáveis por tal associação, visto que estes foram relacionados aos danos observados no tecido hepático de animais com periodontite. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos sobre o tecido renal causados pela periodontite induzida por ligadura em ratas por meio de parâmetros bioquímicos e histomorfométricos. Para isso, vinte e duas ratas foram divididas em dois grupos: controle (sem ligadura) e periodontite (com ligadura). Para confirmação do modelo de indução periodontal, os seguintes parâmetros foram avaliados: Índice de sangramento gengival (ISG), mobilidade dentária (MD), índice de profundidade de bolsa (IPB), atividade de mieloperoxidase (MPO) e altura óssea alveolar (AOA). Para os rins, os órgãos foram coletados, pesados, processados e avaliados através de marcadores de função renal sorológico para albumina, creatinina, glicose, colesterol total, ureia, além da determinação urinária de proteínas totais e creatinina, seguidos pela determinação das concentrações de glutathiona (GSH), malondialdeído (MDA), com posterior análise histológica e histomorfométrica. Como resultado ISG, MD, IPB, atividade de MPO e AOA foram significativamente maiores no grupo periodontite quando comparados ao grupo controle, confirmando o modelo de indução periodontal. Dentre os marcadores de função renal, apenas o colesterol apresentou aumento significativo. Ainda, para avaliação bioquímica renal, animais com periodontite apresentaram redução de 46,2% no conteúdo de GSH e para peroxidação lipídica, o grupo periodontite apresentou aumento em 266% nas concentrações de MDA. A avaliação histomorfométrica revelou aumento na circunferência da cápsula de Bowman, área corpuscular, espaço capsular de Bowman, circunferência glomerular, diâmetro glomerular e volume glomerular no grupo periodontite, além da ruptura da borda em escova nos túbulos renais observada pela coloração de ácido periódico de Schiff. Tais alterações podem estar associadas ao aumento do estresse oxidativo e peroxidação lipídica nos rins. No entanto estes não foram suficientes para causar diferenças nos marcadores de função renal.

Palavras-Chave: Doença periodontal, inflamação, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Periodontitis is a chronic inflammatory disease that leads to progressive destruction of supporting tissues and dental protection in response to the presence of biofilm in the periodontal region. The intense inflammatory response results in noxious systemic effects, being associated with the increase of reactive oxygen species, leading to hepatic, endothelial and cardiovascular alterations. However, periodontitis has been studied as one of the risk factors for the emergence of renal diseases, but this relationship remains uncertain. It is believed that modifications in markers of oxidative stress and lipid peroxidation are responsible for such association, since these markers were related to the damage observed in the liver tissue of animals with periodontitis. Thus, the present study aimed to evaluate the effects on renal tissue caused by ligature-induced periodontitis in rats by means of biochemical and histomorphometric parameters. Twenty-two rats were divided into two groups: control (no ligature) and periodontitis (with ligature). To confirm the periodontal induction model, the following parameters were evaluated: gingival bleeding index (GBI), dental mobility (DM), probing pocket depth (PPD), myeloperoxidase activity (MPO) and alveolar bone height (ABH). For the kidneys, the organs were collected, processed and evaluated by serologic markers for serum albumin, creatinine, glucose, total cholesterol, urea, urinary total protein and creatinine, followed by determination of glutathione concentrations (GSH), malondialdehyde (MDA), with histological and histomorphometric analysis. As results GBI, TM, PPD, MPO activity and ABH were significantly higher in the periodontitis group when compared to the control group. Among the markers of renal function only cholesterol presented a significant increase; for renal biochemical evaluation, animals with periodontitis had a 46.2% reduction in GSH content and for lipid peroxidation, the periodontitis group presented a 266% increase in the concentrations of MDA. The histomorphometric evaluation revealed an increase in Bowman's capsule circumference, corpuscular area, Bowman's capsular space, glomerular circumference, glomerular diameter and glomerular volume in the periodontitis group, in addition to the rupture of the brush border in the renal tubules observed by the periodic acid staining of Schiff. Such changes may be associated with increased oxidative stress and lipid peroxidation in the kidneys. However, these changes were not sufficient to cause differences in renal function markers.

Key words: Periodontal disease, inflammation, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia do periodonto.....	18
Figura 2. Desenho esquemático da anatomia gengival.....	19
Figura 3. Desenho representativo do ligamento periodontal.....	20
Figura 4. Imagem ilustrativa da região periodontal demonstrando a estrutura do periodonto saudável.....	21
Figura 5. Imagem ilustrativa da região periodontal demonstrando a estrutura do periodonto saudável (lado esquerdo) e com periodontite (lado direito).....	23
Figura 6. Mesa operatória utilizada no modelo de indução periodontal (A). Cavidade oral do animal após inserção do fio de ligadura (B).....	33
Figura 7. Mandíbula corada com solução aquosa de azul de metileno a 1% (Dinâmica®).....	35
Figura 8. Representação dos aspectos clínicos da cavidade oral dos animais do grupo controle (A) e grupo periodontite (B). Resultados clínicos para parâmetros como: ISG (C), MD (D) e bioquímicos teciduais para dosagens de MDA (E), MPO (F) na gengiva dos animais.....	40
Figura 9. Mandíbula corada com solução aquosa de azul de metileno a 1% (Dinâmica®), demonstrando diferenças clínicas entre o osso alveolar nos grupos controle (A) e periodontite (B). Soma total das AOA para grupo periodontite em comparação ao grupo controle (C). Resultados para o parâmetro clínico IPB entre o grupo controle e periodontite (D).....	41
Figura 10. Representação dos resultados para concentração de GSH renal dos grupos controle e periodontite (A). Concentração de MDA renal entre os grupos controle e periodontite (B).....	43

Figura 11. Corte histológico dos rins dos animais, sendo observado grupo controle na coluna da esquerda e grupo periodontite na coluna da direita.....**44**

Figura 12. Análise histomorfométrica renal a partir de parâmetros como: circunferência da cápsula de Bowman (A), área corpuscular renal (B), área da cápsula de Bowman (C), circunferência glomerular (D), diâmetro glomerular (E) e volume glomerular (F).....**45**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação clínica da periodontite através de escores que variam de 0 a 5, demonstrando as características utilizadas para a determinação de cada escore.....**34**

Tabela 2. Avaliação por peso e resultados para dosagens bioquímicas, com média e desvio padrão em amostras de soro e urina.....**42**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOA: altura óssea alveolar
COA: crista óssea alveolar
ERO's: espécies reativas de oxigênio
GSH: glutatona reduzida
IPB: índice de profundidade de bolsa
ISG: índice de sangramento gengival
JEC: junção esmalte cimento
MD: mobilidade dentária
MDA: malondialdeído
MPG: margem e papila gengival
MPO: mieloperoxidase
OPG: osteoprotegerina
PAS: ácido periódico de schiff
TFG: taxa de filtração glomerular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Periodonto	18
2.1.1 Gengiva	18
2.1.2 Ligamento Periodontal.....	19
2.1.3 Cimento radicular	20
2.1.4 Osso alveolar	21
2.2 Periodontite	22
2.3 Sistema urinário	25
2.3.1 Os rins	25
2.3.2 Bexiga e vias urinarias	26
2.4 Doenças renais	27
2.5 Doenças renais e periodontite	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 MATERIAIS E METODOS	32
4.1 Dados éticos da pesquisa	32
4.1.1 Animais.....	32
4.1.2 Anestesia.....	32
4.1.3 Indução da periodontite	32
4.1.4 Delineamento experimental.....	33
4.2 Parâmetros clínicos	33
4.2.1 Mobilidade dentária	33
4.2.2 Índice de profundidade de bolsa	34
4.2.3 Índice de sangramento gengival.....	34
4.3 Análise morfométrica	35
4.3.1 Altura óssea alveolar	35
4.4 Urinálise e método de dosagem	36
4.5 Coleta sanguínea, separação do soro e método de dosagem	36
4.5.1 Albumina	36
4.5.2 Creatinina	36
4.5.3 Glicose	36
4.5.4 Colesterol total.	37
4.5.5 Ureia.....	37

4.5.6	Proteínas totais	37
4.5.7	Creatinina	37
4.6	Colheita e pesagem dos rins	37
4.7	Dosagens bioquímicas no tecido	38
4.7.1	Concentração de Malondialdeído	38
4.7.2	Concentração de glutatona.....	38
4.7.3	Níveis de mieloperoxidase	38
4.8	Análise histomorfométrica	39
4.9	Análise estatística	39
5	RESULTADOS.....	40
5.1	ISG, MD, MDA, MPO	40
5.2	Avaliação da AOA e IPB.....	41
5.3	Peso corporal e renal	41
5.4	Biomarcadores sorológicos e urina	42
5.5	Níveis de GSH e MDA renais	43
5.6	Avaliação histológica e histomorfométrica do tecido renal	44
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÃO	50
	REFERENCIAS.....	51
	APÊNDICE I – Artigo Publicado.....	63
	ANEXO A – Aprovação Comitê de Ética em Experimentação Animal	64

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença de caráter infeccioso e inflamatório que leva a gradativa destruição das estruturas e tecidos conectivos do suporte dentário em resposta à presença de biofilme na região periodontal (KNIGHT et al., 2016). Alguns fatores estão envolvidos no seu aparecimento e desenvolvimento, dentre eles, variações genéticas do hospedeiro (SILVA et al., 2015; DA SILVA et al., 2017; DA SILVA et al., 2018) e fatores comportamentais dentre eles: hábito de fumar, ingestão de bebida alcoólica e má higiene bucal (EKE et al., 2012).

A destruição dos tecidos na doença resulta de desequilíbrios entre a resposta inflamatória e imunidade, causando liberação de inúmeras citocinas, quimiocinas, enzimas proteolíticas, espécies reativas de oxigênio (ERO's) e outros mediadores que levam à degeneração irreversível do periodonto. Tais reações levam a fortes associações com alterações em diversos órgãos, como as encontradas no tecido hepático (TOMOFUJI et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2017).

Devido ao processo inflamatório local, enzimas como mieloperoxidase (MPO), apresentam-se em elevadas concentrações em gengiva e saliva de pacientes com periodontite, atuando como biomarcador importante na doença periodontal (MARCACCINI, et al., 2010). Além disso, estudos comprovam que a peroxidação lipídica e estresse oxidativo participam ativamente na destruição local, evidenciadas pelas elevadas concentrações de Malondialdeído (MDA) e redução do conteúdo de glutathiona (GSH), em saliva e líquido crevicular em pacientes com periodontite (MIRICESCU et al., 2014; TRIVEDI et al., 2015).

Por outro lado, as doenças renais são definidas por uma diversidade de fatores como: anormalidades estruturais ou funcionais do rim, com ou sem diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG), evidenciadas por histopatologia ou marcadores de função renal (CHEN et al., 2006; CHONCHOL et al., 2008). Nos últimos dez anos, a associação entre periodontite e problemas relacionados ao sistema renal, vem sendo estudadas (OFFENBACHER et al., 2008; BAYRAKTAR et al., 2009; THORMAN et al., 2009; UM et al., 2010).

Observou-se, através de um estudo de metanálise, que o risco de desenvolver algum tipo de doença renal crônica seria 60% maior em pacientes que apresentavam periodontite (KAPELAS et al., 2018). Ainda, o índice de mortalidade em doentes renais crônicos era de 70,6%, 41,8% e 24% onde tais indivíduos apresentavam periodontite grave, moderada e leve respectivamente (CHEN et al., 2011). Outro estudo relata que após tratamento não cirúrgico para periodontite, pacientes renais tiveram melhora significativa na TFG (ARTESE et al., 2010). Desta forma, alguns autores tentaram explicar a relação entre periodontite e doença renal.

Contudo, os mecanismos envolvidos na associação entre essas doenças ainda não estão claros. Embora vários estudos tenham relatado a associação entre periodontite e doença renal (PONTES ANDERSEN et al., 2008; SHARMA et al., 2014; ZHAO et al., 2014; CAÚLA et al., 2015; GRAUBALLE et al., 2015; AUSAVARUNGNIRUN et al., 2016), nenhum estudo avaliou a influência das concentrações de marcadores de estresse oxidativo (GSH) ou peroxidação lipídica (MDA) nos tecidos renais, visto que tais marcadores estão ligados a alterações hepáticas em animais com periodontite (CARVALHO et al., 2017) e apenas um estudo investigou mudanças nos rins causadas por influência sistêmica da periodontite (PONTES ANDERSON et al., 2008).

Desta forma, para melhor esclarecer a relação entre periodontite e doenças renais, o presente estudo tem como objetivo avaliar os níveis bioquímicos estresse oxidativo e peroxidação lipídica no tecido renal dos animais e mensurar histomorfometricamente os rins de ratas com periodontite induzida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Periodonto

O periodonto compreende o conjunto de quatro diferentes tecidos de conexão possibilitando suporte e apoio dos dentes, facilitando sua fixação aos ossos da mandíbula e maxila. Estas estruturas são especializadas e definem sua função na sustentação do dente, sendo denominadas: gengiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar (HO et al., 2007; LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2008; LIN et al., 2009;). Cada um desses componentes apresenta arquitetura e propriedades bioquímicas que se adaptam durante toda a vida (Figura 1) (NEWMAN et al., 2011).

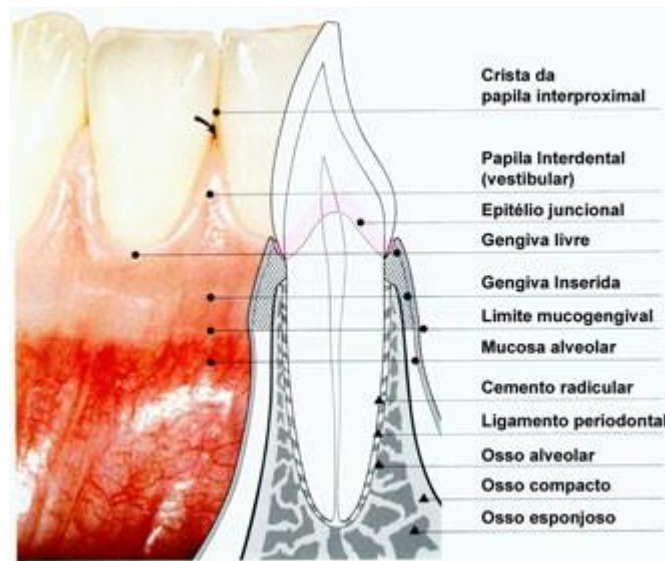


Figura 1. Anatomia do periodonto. Fonte: BULHÕES (2016)

2.1.1 Gengiva

A gengiva é classificada como tecido epitelial de revestimento estratificado pavimentoso não queratinizado constituído de tecido conjuntivo ou lâmina própria (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Ela ainda pode ser dividida em gengiva livre situada cerca de 2 mm acima da linha coronal da crista óssea alveolar até a junção amelocementária ou junção esmalte-cemento e na gengiva ligada que se

estende da base da gengiva livre até a junção mucogengival (LINDHE; KARRING; ARAÚJO, 2008; WALSH; NARAYANAN, 2000).

Geralmente apresenta uma cor descrita como "rosa coral", embora variações sejam possíveis por fatores como: espessura, grau de queratinização do epitélio, fluxo sanguíneo, pigmentação natural, doença e medicamentos (NASSER et al., 2012). A gengiva destaca-se por recobrir estruturas dentárias importantes como o osso alveolar e a raiz do dente, servindo como barreira física contra invasão de bactérias e outros micro-organismos presentes na cavidade oral (PINTO et al., 2016) (Figura 2).

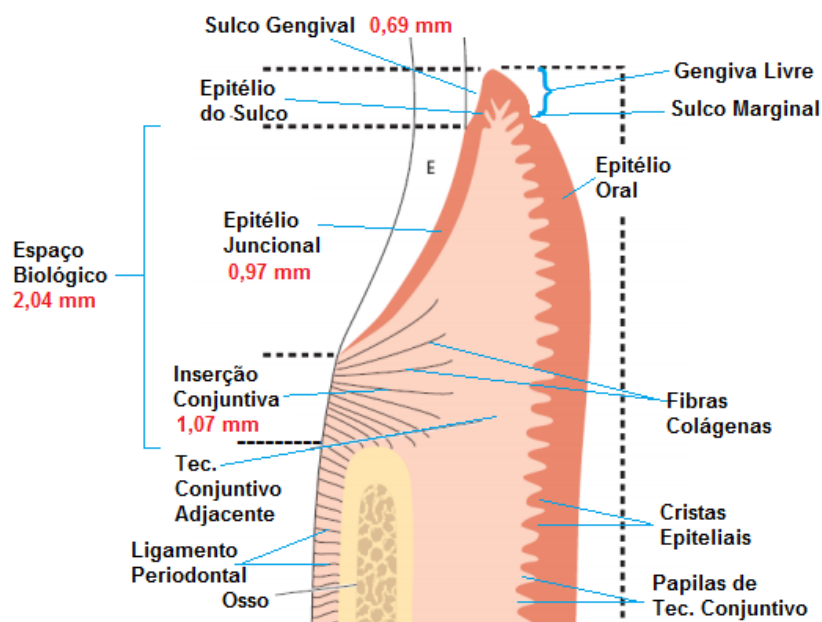


Figura 2. Desenho esquemático da anatomia gengival. Fonte: BULHÕES (2016)

2.1.2 Ligamento periodontal

O ligamento periodontal proporciona a fixação dos dentes ao osso alveolar e cemento. Ele é constituído por grande parte de água, possibilitando que o dente suporte cargas de estresse, devido aos movimentos mastigatórios, permitindo que as fibras transfiram a carga entre o dente e o osso (MCCORMACK et al., 2014).

Ele é constituído por vasos sanguíneos, linfáticos e uma cadeia nervosa do ligamento. A maior parte dos vasos sanguíneos surgem a partir da medula óssea dando suporte nutricional ao osso e a prolongamentos dos vasos

periapicais. As terminações nervosas encontram-se entre as fibras do ligamento periodontal, permitindo juntamente a rede nervosa estímulos para auxiliar no movimento mastigatório. Ainda, no tecido conjuntivo, encontram-se alguns elementos celulares tais como: cementoblastos, cementoclastos, fibroblastos, osteoclastos, osteoblastos, células do sistema imunológico como macrófagos e mastócitos. Estas células além de secretarem os componentes da matriz extracelular e as próprias fibras colágenas, participam ativamente na regeneração local (Figura 3) (JÖNSSON et al., 2011).

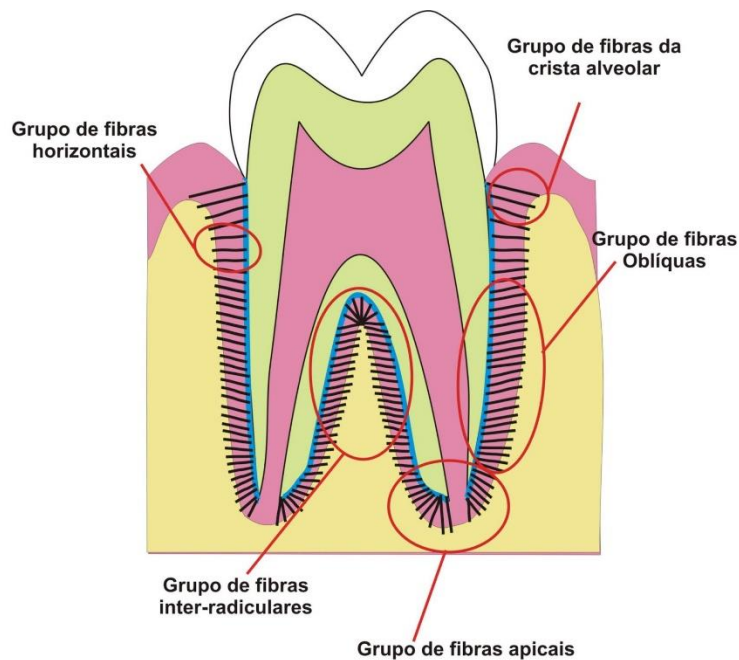


Figura 3. Desenho representativo do ligamento periodontal. Fonte: BULHÕES (2016)

2.1.3 Cimento radicular

O cimento é uma substância calcificada especializada que cobre a raiz dos dentes, permitindo a ligação entre os dentes ao osso alveolar e ao ligamento periodontal (CHERIAN, 2011). Este tecido mineralizado pode ser dividido em duas porções: acelular e celular. A porção acelular é uma camada fina que reveste a superfície das raízes dentais permitindo a conexão entre a região periodontal e superfície da raiz (BOSSHARDT, 2005; FOSTER et al., 2007), sendo composta principalmente de fibras colágenas e substância fundamental. Por sua vez, o

tecido que forma o cemento celular apresenta características semelhantes ao próprio osso, revestindo as superfícies apicais das raízes dentais (FOSTER et al., 2013), cuja principais funções são fornecer suporte, proteção a dentina, firmeza dos dentes, manutenção da relação oclusal, reparação de defeitos na raiz após reabsorção ou fraturas e proteção da polpa dentária (BOSSHARDT, 2005).

2.1.4 Osso alveolar

O osso alveolar forma os alvéolos dentários, sendo constituído pela parede interna composta por lâmina cribiforme que é formada de osso compacto, osso de sustentação, osso esponjoso trabecular e pelas tábuas ósseas vestibulares e palatinas. Apresentando uma matriz calcificada com osteócitos e osteoblastos em lacunas, auxiliando na manutenção óssea (RAMS; LISTGARTEN; SLOTS, 2018).

O osso alveolar é o menos estável dos tecidos periodontais, estando sujeito a períodos constantes de formação e reabsorção, sendo essa característica fundamental para diferenciação do restante dos ossos do corpo pois são regulados por fatores locais e gerais (LEE et al., 2015). Apresenta-se em duas composições: uma matriz orgânica e outra porção mineralizada. A primeira é constituída pela rede de osteócitos, osteoblastos, osteoclastos e matriz extracelular e segunda formada por cálcio, fosfato e cristais de hidroxapatita (LEE et al., 2015). Algumas das estruturas que formam o periodonto estão representadas na figura 4.

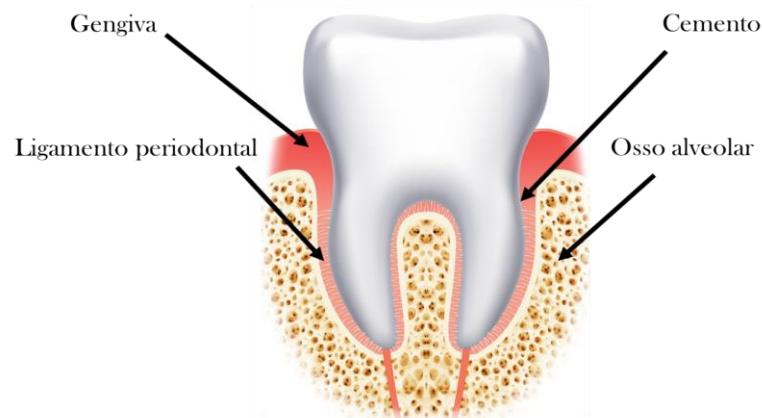


Figura 4. Imagem ilustrativa da região periodontal demonstrando a estrutura do periodonto saudável. Fonte: DI LENARDO (2018).

2.2. Periodontite

A periodontite se caracteriza por uma reação inflamatória em resposta à presença de periodontopatógenos localizados na região periodontal (REICHERT et al., 2013) que leva a destruição de tecidos de suporte dentário e podendo levar até mesmo a perda do dente (ELTAS; USLU, 2013). Sua prevalência varia conforme sexo, idade, fatores sociais, higiene oral e ainda hábitos como: a ingestão de álcool, tabagismo (GENCO; BORGANAKKE, 2013) e fatores genéticos do hospedeiro (SILVA et al., 2015; DA SILVA et al., 2017; DA SILVA et al., 2018).

A doença é uma das mais importantes na odontologia, apresentando prevalência mundial de 10% a 15% (KASSEBAUM et al., 2014), e somente nos Estados Unidos acredita-se afetar cerca de 42% de toda população adulta (EKE et al., 2018). Os dados epidemiológicos brasileiros apontam para cerca de 86,7% dos indivíduos apresentem algum tipo de atividade de doença periodontal, refletindo a importância dos estudos da doença, colocando a periodontite como um problema de saúde pública (CHAMBRONE; LIMA; CHAMBRONE, 2008; SUSIN; HAAS; ALBANDAR, 2014).

Apesar de sua característica multifatorial, a presença do biofilme desencadeia uma resposta inflamatória (AMAYA et al., 2013; LIU; LERNER; TENG, 2010). Localmente, lipopolissacarídeos oriundos de periodontopatógenos induzem infiltrado inflamatório com recrutamento de polimorfonucleares e macrófagos (ANDIA et al., 2013) que liberam fator de necrose tumoral, interleucinas 1 e 17, prostaglandina E₂, entre outras (CARDOSO et al., 2009; CAVALLA et al., 2014; NIBALI et al., 2009; SHAO et al., 2009). As citocinas liberadas, além de modularem a resposta inflamatória, também atuam sobre a reabsorção óssea, sendo importantes mediadores inflamatórios na fisiopatologia da doença (Figura 5) (ALI et al., 2011).

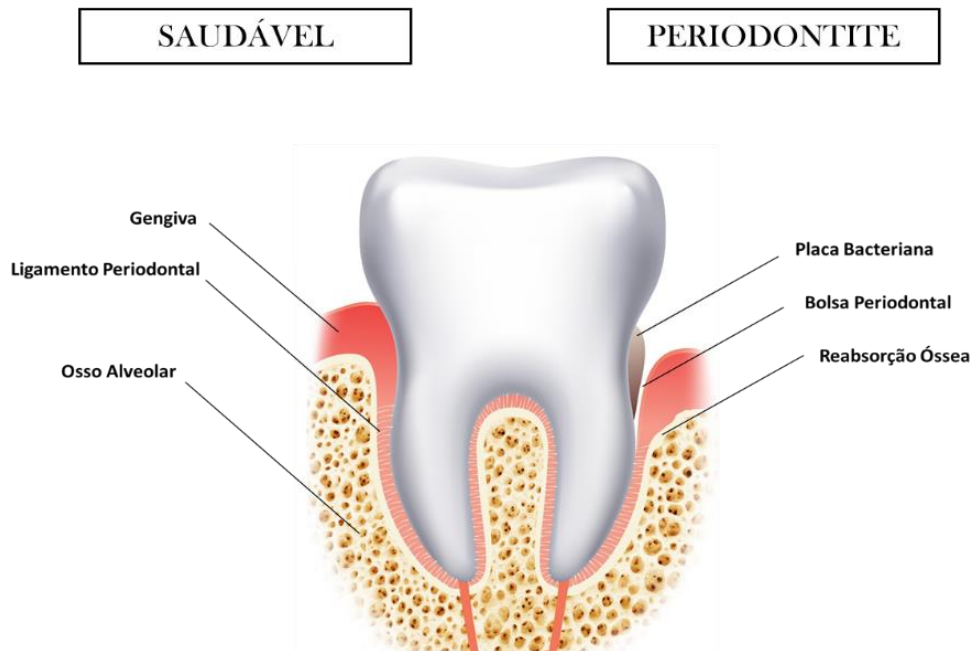


Figura 5. Imagem ilustrativa do periodonto saudável (lado esquerdo) e com periodontite (lado direito). Fonte: DI LERNARDO (2018).

Na fisiologia do tecido ósseo alveolar, também é observada a ação do Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B (RANKL), seu receptor, o Receptor Ativador do Fator Nuclear κ B (RANK) e de seu antagonista natural, a osteoprotegerina (OPG) (BUDUNELI; KINANE, 2011), responsável pela perda óssea periodontal (PÉREZ-SAYÁNS et al., 2010).

RANK/RANKL promovem a diferenciação de macrófagos em osteoclastos maduros multinucleados estimulando a reabsorção óssea do osso alveolar (MORI, 2013). O RANKL é produzido e secretado por diversos tipos celulares, dentre eles fibroblastos, linfócitos T e monócitos (LIU; LERNER; TENG, 2010). Por outro lado, o RANKL também sofre ação da molécula OPG, produzida pelos mesmos tipos celulares, atuando no bloqueio da osteoclastogênese (HOFBAUER; SHOPPET, 2002). A expressão de RANKL assim como de OPG, em quadros fisiológicos normais, é mediada por interações célula-célula (THEOLEYRE et al., 2004).

Entretanto, moléculas como a IL-1 induzem maior síntese de RANKL por células da medula óssea e conseqüentemente maior reabsorção de tecido ósseo (BOYCE; XING, 2008; MORI et al., 2013), além de que a IL-8, quimiotática para neutrófilos é também secretada por este tipo celular, induzindo a expressão de

TNF- α com recrutamento de linfócitos T, que ao secretarem RANKL atuam como indutores de reabsorção óssea (VERDE et al., 2015).

Devido ao processo inflamatório local, inúmeros marcadores inflamatórios estão envolvidos, dentre eles, a mieloperoxidase (MPO) (KLEBANOFF et al., 2005). A MPO é uma enzima peroxidase que em humanos é codificada pelo gene MPO localizado no cromossomo 17 sendo uma das mais abundantes enzimas expressas em grânulos neutrofílicos para realizar sua atividade antimicrobiana (RUSSELL et al., 2017). O aumento desta enzima está associado a quadros de periodontite, e ainda foi capaz de apresentar valores reduzidos após tratamento periodontal, sendo então, um importante aliado no prognóstico da doença (MARCACCINI, et al., 2010).

Além disso, estudos comprovam que a peroxidação lipídica, avaliada por um dos seus subprodutos, o malondialdeído (MDA) (DAVEY et al., 2005) e estresse oxidativo, avaliado pelos níveis de glutathiona (GSH), encontrada na maioria das células apresentando importante papel antioxidante (SZAROMA; DZIUBEK, 2011), são fatores associados diretamente a destruição periodontal, em que observam-se concentrações elevadas de MDA e redução do conteúdo de GSH em saliva e líquido crevicular de pacientes com periodontite (TRIVEDI et al., 2015; MIRICESCU et al., 2014).

Além disso, a periodontite está associada a efeitos sistêmicos como: diabetes (CHAPPELE et al., 2013), problemas cardiovasculares (TONETTI; VAN DYKE, 2013) e hepáticos (VASCONCELOS et al., 2017). Acredita-se que existam duas principais hipóteses para tais associações. A primeira causada pela entrada direta de bactérias na corrente sanguínea (OHKI et al., 2012) e a segunda devido aos metabolitos gerados durante o processo inflamatório (BANSAL et al., 2014).

Ainda, estudos recentes demonstram que a doença é capaz de provocar alterações sistêmicas em ratos, associadas ao aumento de estresse oxidativo no fígado de animais com periodontite (CARVALHO et al., 2017).

2.3 Sistema urinário

O sistema urinário é formado por dois rins, dois ureteres, uma bexiga e uretra. A urina é produzida nos rins, passa pelos ureteres até a bexiga sendo lançada ao exterior pela uretra. Esse sistema contribui para a manutenção da homeostase, produzindo a urina, onde são eliminados diversos resíduos do metabolismo, água, eletrólitos e não eletrólitos produzidos no meio interno (REVELES et al., 2007).

Essas funções se realizam nos túbulos uriníferos por meio de um processo complexo que envolve filtração, absorção ativa, absorção passiva e secreção. Além da função reguladora da composição do meio interno, os rins secretam hormônios como a renina, que participa na regulação da pressão sanguínea e hormônios essenciais que participam junto com outros órgãos (fígado, pele), na ativação da vitamina D3, um pró-hormônio esteroide, no hormônio ativo (REVELES et al., 2007).

2.3.1 Os rins

Estão localizados no espaço retroperitoneal da parede abdominal posterior, cada um do lado da coluna vertebral, na altura da 12^a vértebra torácica à terceira vértebra lombar, sendo o rim direito ligeiramente mais inferior, por causa da posição do fígado. Cada rim pesa cerca de 150g e mede 10-12cm de comprimento, 4-6 cm de largura e 2-3cm de espessura, apresentando um formato de grão de feijão, uma borda convexa e outra côncava, na qual se situa o hilo, onde entram e saem vasos sanguíneos, entram nervos e saem os ureteres (GARTNER; HIATT, 2007).

As unidades funcionais do rim são os néfron, que se caracterizam em estruturas microscópicas, contendo um corpúsculo renal seguido do túbulo proximal, alça de Henle, tubo distal e ducto coletor (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O corpúsculo renal é constituído pelo glomérulo, que é envolvido pela capsula de Bowman, os glomérulos presentes aos milhares em cada rim são constituídos por pequenos enovelados de capilares permitindo a passagem do filtrado.

Este filtrado se acumula no interior da cápsula de Bowman, passando pela parede dos capilares, a qual retém um grande número de proteínas, por meio de um sistema coletor formado pelos segmentos do túbulo contorcido proximal, alça de Henle, túbulo contorcido distal e ducto coletor. Ao passar por este sistema diversas substâncias são reabsorvidas através da parede tubular, e ao mesmo tempo, outras são excretadas para o interior dos mesmos (DELAMARCHE, 2006).

O túbulo contorcido proximal é formado pelo tecido epitelial cúbico com presença de microvilos ou bordas em escovas, nele ocorre a maior parte de reabsorção de glicose, proteínas e eletrólitos por transporte ativo através da parede tubular, retornando ao sangue que circula no interior dos capilares peritubulares, que se situam externamente aos túbulos (DELAMARCHE, 2006).

Em seguida, o filtrado alcança a alça de Henle, dividida no ramo descendente e ascendente. O ramo descendente da alça é permeável à água e ao cloreto de sódio diferente do ramo ascendente, que é impermeável à esta molécula. Dessa forma, o filtrado ao fluir por essa alça tem os íons sódio bombeados para o exterior da alça, carregando o cloreto resultando em um acúmulo de cloreto de sódio no interstício medular renal (SANATKHANI; SAIDI; BANAZADEH, 2016).

No segmento do túbulo contorcido distal, ocorre bombeamento de sódio do interior para o exterior do túbulo por meio da bomba de sódio e potássio, o contrário ocorre com o potássio. O transporte de íons sódio do interior para o exterior do túbulo atrai cloreto que por sua vez, atrai água. Esse túbulo é formado pelo tecido epitelial cúbico, sendo parecido com o túbulo proximal, contudo uma das diferenças observada para diferencia-los, é a ausência dos microvilos (REVELES et al., 2007).

No ducto coletor, ocorre reabsorção de cloreto de sódio e água, como no segmento anterior, da mesma forma a reabsorção destes é controlada pelo nível de aldosterona e hormônio antidiurético (GALVÃO et al., 2010).

2.3.2 Bexiga e vias urinárias

A urina sai dos rins pelos cálices menores e pelos cálices maiores, os quais se unem na pelve renal, a parte superior e expandida do ureter. Os ureteres são tubos fibromusculares de 4 a 5mm de diâmetro e 14cm de comprimento que conduzem a urina através de contrações peristálticas para a bexiga, onde é armazenada sendo revestidos pelo epitélio de transição. A variação na forma das células de globosas ou poliédricas para pavimentosas permite a distensão do tecido e assim a acomodação do órgão às mudanças no volume de urina. (KIERSZENBAUM; TRES, 2016).

A uretra masculina é dividida em: prostática (3 a 4cm), membranosa (1 a 2cm) e peniana (15cm). A uretra prostática apresenta epitélio de transição; a uretra membranosa, epitélio pseudoestratificado colunar ou estratificado colunar, e a uretra peniana (ou esponjosa), epitélio pseudoestratificado colunar, estratificado colunar e, próximo ao meato uretral, epitélio estratificado pavimentoso. A uretra no homem é responsável pela passagem de urina e sêmen (LOWE; ANDERSON, 2015).

A uretra feminina, conforme sua proximidade com a bexiga e ao meio externo, o epitélio pode ser de transição, pseudoestratificado colunar, estratificado colunar ou estratificado pavimentoso, sendo este último o tecido predominante. Na porção média da uretra, há um esfíncter de músculo estriado esquelético, o esfíncter externo, responsável pelo controle voluntário da micção (JUC; COLOMBARI; SATO, 2011).

2.4 Doenças renais

As doenças renais são definidas por anormalidades estruturais ou funcionais do rim, com ou sem diminuição da TFG, evidenciadas por histopatologia ou marcadores de lesão renal, incluindo alterações sanguíneas e urinárias, vistas através de exames de imagem (CHEN et al., 2006; CHONCHOL et al., 2008).

A doença renal caracteriza-se por uma perda progressiva da função dos néfrons, desde a filtração glomerular, equilíbrio da volemia, controle da pressão arterial e dos eletrólitos, até as capacidades endócrinas renais, desencadeando

uma série de fenômenos humorais e celulares, resultando no declínio progressivo da TFG, podendo resultar até a perda da função renal (KOVESDY, 2010).

As doenças renais afetam cerca de 10% de toda população mundial (ECKARDT et al., 2013) e que somente nos Estados Unidos, 14,8% da população norte americana foi diagnosticada com problemas relacionados a este sistema, levando a custos de 64 bilhões anuais (SARAN et al., 2017). Ainda, dados brasileiros apontam para cerca de 499 para cada milhão de habitante apresente algum tipo de doença renal, representando quase 10% dos gastos orçamentários da saúde (SESSO et al., 2014).

Os fatores de risco incluem idade acima de 60 anos, hipertensão arterial, diabetes mellitus, obesidade, macroalbuminúria, tabagismo, proteína C-reativa elevada, colesterol total elevado, baixos níveis de HDL, níveis elevados de LDL, síndrome cardiometabólica e alterações no código genético (PENTON et al., 2018; WEBSTER et al., 2017). Dentre os fatores de risco não tradicionais que possam contribuir para doenças renais, estão incluídos a doença periodontal (BORAWSKI et al., 2007; BAYRAKTAR et al., 2009).

2.5 Doenças renais e periodontite

Através de um estudo de metanálise (KAPELAS et al., 2018) observou-se que o risco de desenvolver algum tipo de doença renal crônica seria 60% maior em pacientes que apresentavam periodontite. Ainda, o índice de mortalidade em doentes renais era de 70,6%, 41,8% e 24% onde tais indivíduos apresentavam periodontite grave, moderada e leve respectivamente (CHEN et al., 2011). Outro estudo, que após tratamento não cirúrgico para periodontite, pacientes renais crônicos tiveram uma melhora significativa na TFG influenciando diretamente em seu prognóstico (ARTESE et al., 2010).

Nos últimos 10 anos, vários estudos foram realizados no sentido de relacionar periodontite e problemas renais (OFFENBACHER et al., 2008; BAYRAKTAR et al., 2009; THORMAN et al., 2009; UM et al., 2010). No entanto, além de escassos, contraditórios e com metodologia muito variadas, os mecanismos desta relação têm sido explicados por diversos autores, em virtude

de alterações no periodonto provocadas principalmente pela carga inflamatória sistêmica (OFFENBACHER et al., 2007).

Dentre eles, um dos mecanismos que envolvem esta relação, estão associadas à presença de antígenos ou metabólitos bacterianos como o LPS (presente na periodontite) que têm efeitos pleiotrópicos via sistema imunológico, estimulando linfócitos, macrófagos e células *natural killer*, alterando a homeostase da defesa do hospedeiro (STASI et al., 2016). Essas células de defesa liberam quantidades excessivas de ERO's, contribuindo para peroxidação lipídica no rim (RATLIFF et al., 2016).

Além disso, esse desequilíbrio oxidativo já foi associado a dislipidemia, situação já relatada com forte associação à doença periodontal (GRIFFITHS et al., 2010; LUO et al., 2016), promovendo o acúmulo de gotículas lipídicas na urina e células tubulares, bem como alterações na borda em escova dos túbulos renais (IZQUIERDO-LAHUERTA et al., 2016). Além do mais, um estudo em pacientes com doença periodontal grave demonstrou que pacientes renais crônicos estão mais propensos a sofrer dos efeitos da doença renal do que pacientes que apresentam casos mais leves da doença periodontal, associando o aumento do conteúdo de albumina sérica ao estado periodontal destes pacientes (AUSAVARUNGNIRUN et al., 2016). Outros marcadores bioquímicos apresentaram ligação a periodontite crônica, como a redução de níveis séricos de creatinina e aumento de fosfatase alcalina (CAÚLA et al., 2015).

Outra investigação demonstrou que a periodontite causa alteração na função renal tecidual, com tendência ao aumento do volume glomerular e hipertrofia nos rins de ratos pré-diabéticos com periodontite (PONTES ANDERSEN et al., 2008).

Contudo, os mecanismos envolvidos nesta associação ainda não estão claros. Embora vários estudos tenham constatado e relatado a associação entre periodontite e doença renal (PONTES ANDERSEN et al., 2008; SHARMA et al., 2014; ZHAO et al., 2014; CAÚLA et al., 2015; GRAUBALLE et al., 2015; AUSAVARUNGNIRUN et al., 2016), nenhum estudo avaliou a influência das concentrações de marcadores de estresse oxidativo (GSH) ou peroxidação lipídica

(MDA) nos tecidos renais, visto que tais marcadores estão associados a alterações hepáticas em animais com periodontite (CARVALHO et al., 2017) e apenas um estudo investigou mudanças nos rins causadas por influência sistêmica da periodontite através de avaliação histopatológica e histomorfométrica (PONTES ANDERSON et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos causados pela periodontite induzida por fio de ligadura sobre níveis bioquímicos de estresse oxidativo e peroxidação lipídica nos rins e mensurar histomorfometricamente o tecido dos animais.

3.2 Objetivos específicos

- Utilizar os dados para confirmar o modelo de periodontite por meio da altura óssea alveolar (AOA), mobilidade dentária (MD), índice de profundidade da bolsa (IPB), índice de sangramento gengival (ISG);
- Mensurar os níveis de MPO e MDA no tecido gengival dos animais;
- Mensurar o estresse oxidativo do tecido renal por meio de dosagens de GSH e MDA;
- Dosar as atividades enzimáticas de biomarcadores séricos tais como: albumina, creatinina, glicose, colesterol total, uréia;
- Dosar os níveis enzimáticos de biomarcadores na urina, tais como: proteínas totais e creatinina;
- Verificar o peso corporal, relativo e absoluto dos rins de cada animal;
- Analisar histopatológica e histomorfometricamente o tecido renal dos animais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Dados éticos na pesquisa

Este projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal do Piauí, com protocolo de número 061/14 (Anexo A).

4.1.1 Animais

Neste estudo, foram utilizadas 22 ratas (*Rattus norvegicus*) albinos Wistar, alimentadas com ração e água *ad libitum* e mantidas em ambiente com ciclo de 12 horas claro/escuro, a uma temperatura de 25 ± 2 °C (CIRANO et al., 2016).

4.1.2 Anestesia

Os animais foram anestesiados por meio de uma injeção de 46 mg/kg de anestésico cloridrato de ketamina (Dopalen, SP, Brasil) e 10 mg/kg de relaxante muscular cloridrato de Xilazina (Anasedan, SP, Brasil) (MORADI et al., 2014).

4.1.3 Indução da periodontite

Após anestesiados, os animais foram posicionados em uma mesa operatória específica (Figura 6A), permitindo a visualização da cavidade oral e o acesso aos primeiros molares inferiores direito e esquerdo. Em seguida, com o auxílio de uma agulha cirúrgica proveniente do fio de nylon (3.0) (Procure®), foi realizada a luxação da região interdental, entre o primeiro e segundo molar. O fio de nylon foi transposto entre os dois primeiros molares em ambos os lados, onde dois nós foram utilizados para estabilizar os fios em cada molar inserido como demonstrado na Figura 6B (ABE; HAJISHENGALLIS, 2013).

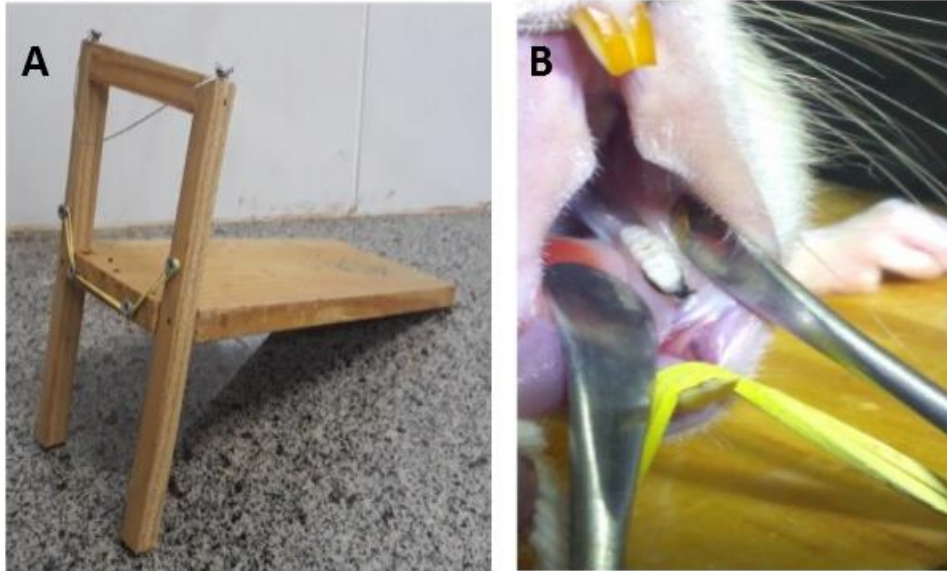


Figura 6. Mesa operatória utilizada na inserção do fio de ligadura (A). Cavidade oral após inserção do fio de ligadura nos animais (B). Fonte: Próprio autor

4.1.4 Delineamento experimental

Os animais foram então divididos em dois grupos contendo 11 animais dispostos da seguinte forma: grupo controle (sem ligadura) pesando ($159,0 \pm 0,1$ g); grupo periodontite (com ligadura) pesando ($163,7 \pm 0,1$ g) que foram submetidos ao modelo de indução periodontal e mantidos durante 20 dias (VASCONCELOS et al., 2017). Após o término do período experimental, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico cloridrato de ketamina (Dopalen, SP, Brasil) 300 mg/kg e cloridrato de Xilazina (Anasedan, SP, Brasil) 30mg/kg (SOUZA FILHO et al, 2018).

4.2 Parâmetros clínicos

Para avaliar os parâmetros clínicos de cada animal, um examinador realizou de forma cega, a análise da região dos primeiros molares inferiores em ambos os lados de cada espécime em busca dos parâmetros citados abaixo.

4.2.1 Mobilidade dentária (MD)

Com a utilização de uma sonda periodontal, verificou-se a mobilidade dos primeiros molares inferiores de ambos os lados utilizando a metodologia descrita por Xu et al., (2006), cujos resultados foram divididos em três parâmetros qualitativos: fisiológica (+), moderada (++) e intensa (+++).

4.2.2 Índice de profundidade da bolsa (IPB)

Para a determinação da IPB, uma sonda periodontal (ponta de 0,2 mm de raio) foi utilizada e três pontos foram avaliados na medição (mesiovestibular, disto-vestibular e mediobucal) (LIU et al., 2012).

4.2.3 Índice de sangramento gengival (ISG)

A bolsa periodontal do primeiro molar inferior de ambos os lados foi sondada por dez segundos e classificada de acordo com Liu et al., (2012) nos escores de 0, 1, 2, 3, 4 e 5, descritos na tabela 1.

Escore	Inflamação	Alteração de cor	Edema	Úlcera	Hemorragia
0	Não	Não	Não	Não	Não
1	Leve	Não	Não	Não	Não
2	Leve	Sim	Não	Não	No ponto (leve)
3	Moderada	Sim	Leve	Não	Para fora do sulco (moderada)
4	Severa	Sim	Grave	Sim	Para fora do sulco (moderada)
5	Severa	Sim	Grave	Sim	Espontânea (severa)

Tabela 1. Avaliação clínica da periodontite, com escores de 0 a 5, a tabela mostra as características utilizadas para a determinação de cada escore.

4.3 Análise morfométrica

4.3.1 Altura óssea Alveolar (AOA)

AOA foi obtida através da delimitação da junção esmalte-cimento (JEC), até a crista óssea alveolar, obtidas por coloração previa em solução aquosa de azul de metileno 1% (Dinâmica®), a imagem da altura do osso alveolar para cada hemimandíbula foi capturada utilizando um estereomicroscópio com ampliação de 30x. Para a avaliação das alturas ósseas alveolares, foi utilizado protocolo descrito por Vasconcelos et al. (2017). Três pontos foram medidos a partir da região lingual: a) AOA-1, a distância foi obtida medindo-se a altura a partir da JEC à crista alveolar, na porção anterior (mesial) dos primeiros molares inferiores; b) AOA-2, a distância foi obtida através da medição da altura a partir da JEC à crista alveolar, na raiz mesial dos primeiros molares inferiores; c) AOA-3, a distância foi obtida medindo-se a altura a partir da JEC à crista alveolar, na raiz intermediária dos primeiros molares inferiores (Figura 7). Utilizou-se a seguinte fórmula para calcular a soma das três AOA: $AOA = AOA -1/3 + AOA -2/3 + AOA -3/3$. Estas imagens, bem como as imagens da análise histológica, foram avaliadas por sistema de análise de imagens (ImageJ v.1.48 Media Cybernetics).

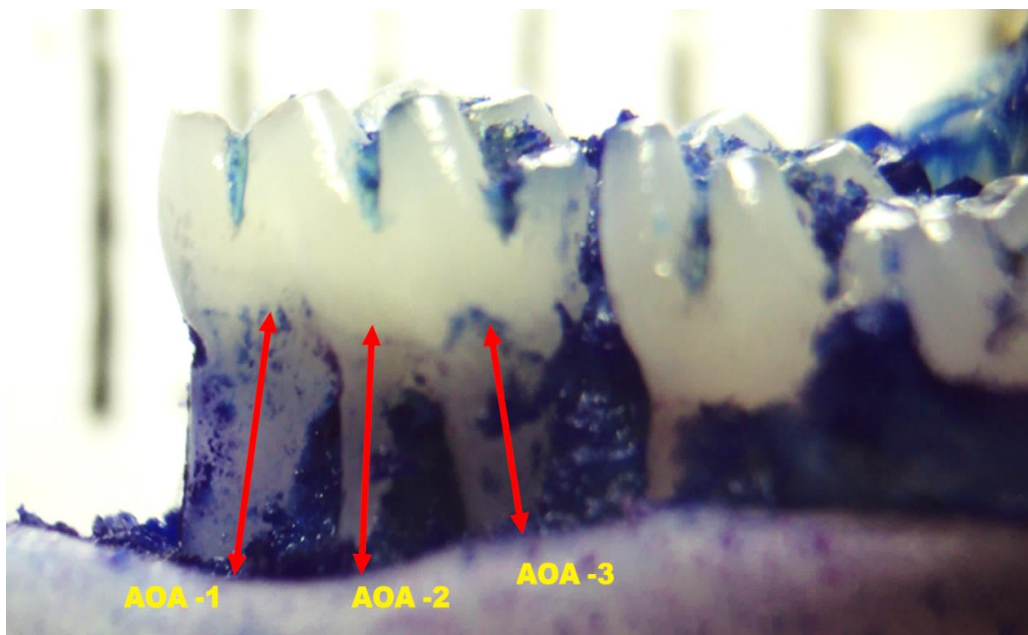


Figura 7. Mandíbula corada com solução aquosa de azul de metileno a 1% (Dinâmica®).

4.4 Urinálise e método de dosagem

As amostras de urina foram obtidas após posicionamento dos animais em uma bancada contendo um saco estéril, onde permaneceram com auxílio de um indivíduo responsável pela manipulação de cada animal. Assim, esses animais acabavam realizando suas necessidades fisiológicas neste local, sendo então coletada com o auxílio de um micropipetador e acondicionadas em tubos de ensaio para posterior análise em espectrofotômetro (UV-1800 Shimadzu Kyoto, Japão).

4.5 Coleta sanguínea, separação do soro e método de dosagem

As amostras de sangue foram obtidas em quantidade média de 1,5 ml, através do plexo retro orbital dos animais com o auxílio de micro capilares sanguíneos e dispostas em tubos de vidro. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas (Excelsa II 206 BL) em velocidade de 3000 rpm durante 10 minutos. Em seguida o soro foi separado utilizando-se um micropipetador e armazenado em tubos de ensaio para posterior análise em espectrofotômetro (UV-1800 Shimadzu Kyoto, Japão) (PONTES ANDERSEN et al., 2006).

4.5.1 Albumina

Para a obtenção do nível de albumina sérico, utilizou-se o Kit ALBUMINA (LABTEST, REF: 19). Sendo manuseadas de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5.2 Creatinina

Para a obtenção do nível de Creatinina sérico, utilizou-se o Kit CREATININA (LABTEST, REF: 35). Sendo manuseada de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5.3 Glicose

Para a obtenção do nível glicose sanguínea, obteve-se antes da eutanásia dos espécimes por meio de um glicosímetro (Accu-Chek Active, São Paulo, SP, Brasil).

4.5.4 Colesterol total

Para a obtenção do nível de colesterol total, utilizou-se o Kit COLESTEROL LIQUIFORM (LABTEST, REF: 76). Sendo manuseadas de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5.5 Ureia

Para a obtenção do nível de ureia sérico, utilizou-se o Kit URÉIA CE (LABTEST, REF: 27). Sendo manuseada de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5.6 Proteínas totais

Para a obtenção do nível de proteínas totais na urina, utilizou-se o Kit PROTEINAS TOTAIS (LABTEST, REF: 99). Sendo manuseadas de acordo com as recomendações do fabricante.

4.5.7 Creatinina

Para a obtenção do nível de Creatinina na urina, utilizou-se o Kit CREATININA (LABTEST, REF: 35). Sendo manuseada de acordo com as recomendações do fabricante.

4.6 Colheita e pesagem dos rins

Após avaliação clínica e coleta do sangue via plexo retro orbital, os rins de cada animal foram retirados, seguidos de uma inspeção macroscópica para quaisquer alterações perceptíveis. Em seguida as amostras foram pesadas e acondicionadas em tubos de vidro para dosagens bioquímicas e cassetes

mantidos em formaldeído 10% tamponado onde permaneceram até posteriormente passarem por processamento histológico.

4.7 Dosagens bioquímicas nos tecidos

4.7.1 Concentração de MDA

O MDA do tecido renal foi obtido pela reação do ácido tiobarbitúrico, obtido através da solução homogeneizada de 35 mg do tecido com 10% de KCL 15M. Posteriormente, foi transferido em banho-maria por 45 minutos a 100°C. em seguida, 2 ml de n-butanol P foi acrescentado à solução e centrifugado à 1200 rpm durante 15 minutos a 4°C. As duas leituras foram obtidas através da fotometria em (A1) a 520 nm e (A2) a 535 nm, onde o resultado final expresso em nmol/g de tecido (MIHARA; UCHIYAMA,1978).

4.7.2 Concentração de GSH

Após pesagem de 40 mg de tecido renal e transferido a uma solução de 5% ácido etilenodiamino tetra-acético 0,02M, 0,320 ml de água destilada e 800 µl de tricloroacético a 50%. O homogeneizado passou por uma centrifugação de 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Em seguida, 400 µl do sobrenadante foi transferido em uma solução de 800 µl de tampão Tris 0,4M à um pH de 8,9 e 0,020ml de DTNB 0,01M. O resultado final foi obtido com o uso do espectrofotômetro através da leitura da absorbância da solução em um comprimento de 420nm. Finalmente os valores foram expressos em µg de GSH/g de tecido (SEDLAK; LINDSAY,1968).

4.7.3 Níveis de MPO

Atividade da MPO foi avaliada para determinar o infiltrado inflamatório no tecido gengival. Onde 40 mg de tecido gengival foi macerado e homogeneizado em 50 mg/mL de tampão fosfato contendo 0,5% brometo de hexadeciltrimetilamônio. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 3.900 rpm durante 6 min a 4 °C. Coletou-se o sobrenadante e a atividade de MPO avaliada pela 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%. O resultado foi expresso em unidades de MPO / mg de tecido. Uma unidade de atividade MPO foi definida como aquela conversão de 1 μmol de peróxido de hidrogênio em água em 1 min a 22°C (BRADLEY, 1982; CHAVES et al., 2013).

4.8 Análise histomorfométrica

As amostras fixadas em formaldeído 10% tamponada foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, imersas em xilol, sendo imersos em parafina. As secções de 5 μm de espessura foram coradas com azul de toluidina, bem como hematoxilina e eosina (ambas para avaliação histomorfométrica) e ácido periódico de Schiff (PAS), para avaliação da borda em escova, com posterior análise sob um microscópio de luz (NOVA®).

A histomorfometria foi realizada de acordo com Imafidon et al. (2016) por um examinador de forma cega (LFCF) e previamente calibrado para os seguintes parâmetros: circunferência do glomérulo e da cápsula de Bowman, área corpuscular renal (μm^2), área glomerular, diâmetro glomerular e volume glomerular (VG). O VG foi avaliado de acordo com Gundersen et al. (1988), em resumo, o VG foi determinado a partir da área média do glomérulo (com aumento de 400 \times). As áreas então foram determinadas previamente através da área média de um total de 240 a 250 perfis glomerulares e o VG calculado da seguinte forma: $A / c (GV)^{3/2}$, onde $A = 1,38$, que é a forma idealizada do glomérulo, e $c = 1,1$, a constante de distribuição de tamanho.

4.9 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e/ou mediana. Para a verificação e distribuição dos dados, utilizou-se o teste estatístico de Shapiro-Wilk. As diferenças entre os grupos controle e periodontite foram investigados pelo teste U de Mann-Whitney quando a distribuição não apresentou

normalidade e teste *T* para distribuição normal. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 ISG, MD, MDA e MPO

O grupo periodontite apresentou papila gengival com alteração de cor, intenso edema e sangramento em comparação ao grupo controle (Figura 4A e 4B, representando controle e periodontite, respectivamente). ISG (Figura 4C), MD (Figura 4D), MDA (Figura 4E) e atividade de MPO (Figura 4F) foram significativamente maiores no grupo periodontite quando comparado ao grupo controle (ISG, grupo controle, 0 (0-1), grupo periodontite, 4 (3-5), $P < 0,05$; MD, grupo controle, 0 (0-1), grupo periodontite, 3 (2-3), $P < 0,05$; concentração de MDA, grupo controle, $32,6 \pm 4,0$, grupo periodontite, $79,2 \pm 4,3$, $P < 0,05$; Atividade de MPO (grupo controle, $3,4 \pm 0,8$, periodontite grupo, $51,6 \pm 8,7$, $P < 0,05$), como demonstrado pela figura 8.

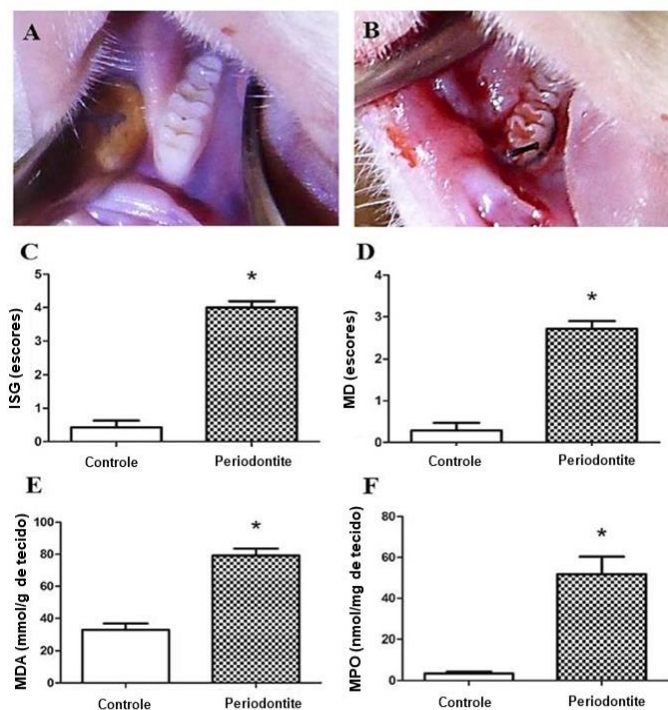


Figura 8. Aspecto clínico da cavidade oral dos grupos controle (A), periodontite (B) e respectivos resultados para ISG (C), MD (D), MDA (E) e MPO (F) entre os grupos controle e periodontite. * $p < 0,05$.

5.2 Avaliação da AOA e IPB

A Figura 9A e 9B ilustram a diferença entre as alturas ósseas alveolares nos animais do grupo controle e periodontite, respectivamente. Houveram diferenças significativas entre a soma dos três pontos avaliados na AOA (grupo controle, $2,0 \pm 0,1$, grupo periodontite, $5,4 \pm 0,3$, $P < 0,05$), entre os grupos controle e periodontite (Figura 9C). Ainda, o grupo periodontite apresentou aumento significativo para o IPB (Figura 9D) (grupo controle, $0,6 \pm 0,1$ mm; grupo periodontite, $3,4 \pm 0,2$ mm; $P < 0,05$).

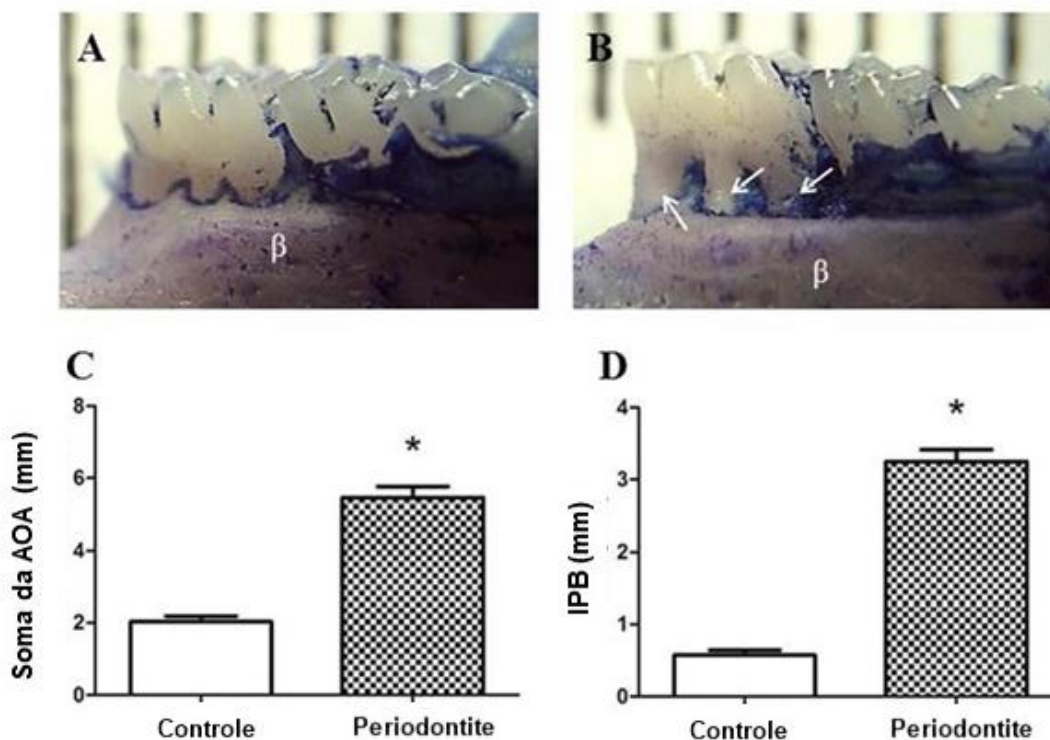


Figura 9. Diferenças clínicas entre o osso alveolar nos grupos controle (A) e periodontite (B) e resultados para Soma AOA total (C) e IPB (D) entre os grupos controle e periodontite. Notar a presença do osso alveolar (β); setas apontam a perda óssea alveolar. * $p < 0,05$.

5.3 Peso corporal e renal

Os pesos corporais (controle $159,0 \pm 0,1$ g; periodontite $163,7 \pm 0,1$ g) e renais absolutos (controle, $1,3 \pm 0,2$ g; periodontite, $1,5 \pm 0,1$ g) e relativos (controle, $0,8 \pm 0,1$ g; periodontite, $0,9 \pm 0,1$ g) não apresentaram diferenças entre os grupos (Tabela 2).

5.4 Biomarcadores sorológicos e urina

Para biomarcadores sorológicos como albumina (controle, $1,9 \pm 0,1$; periodontite, $2,0 \pm 0,1$ g/dL) creatinina (controle, $0,42 \pm 0,1$; periodontite, $0,56 \pm 0,1$ g/dL) glicose (controle, $301,3 \pm 20,2$; periodontite, $272,0 \pm 24,7$ mg/dL) colesterol total (controle, $63,0 \pm 2,0$; periodontite, $98,6 \pm 8,4$ mg/dL) e ureia (controle, $40,4 \pm 4,6$; periodontite, $39,8 \pm 4,8$ U/dL). Para os biomarcadores urinários como proteínas totais (controle, $0,1 \pm 0,0$; periodontite, $0,1 \pm 0,0$ mg/dL) e creatinina (controle, $12,5 \pm 1,1$; periodontite, $15,9 \pm 1,9$ U/dL). Somente o colesterol total foi significativamente maior (56,5%) no grupo periodontite em comparação ao grupo saudável. Outros biomarcadores como: albumina, creatinina, glicose e uréia não apresentaram diferenças significativas. Para os dados urinários, não apontaram resultados significativos para proteínas totais (proteinúria) e creatinina. Todos estes dados estão demonstrados na tabela 2.

Grupo	Controle	Periodontite
Peso		
Corporal (g)	$159,0 \pm 0,1$	$163,7 \pm 0,1$
Rins		
Absoluto (g)	$1,3 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,1$
Relativo (%)	$0,8 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$
Biomarcadores sorológicos		
Albumina (g/dL)	$1,9 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$
Creatinina (U/dL)	$0,42 \pm 0,1$	$0,56 \pm 0,1$
Glicose [#] (mg/dL)	$301,3 \pm 20,2$	$272,0 \pm 24,7$
Colesterol total (mg/dL)	$63,0 \pm 2,0$	$98,6 \pm 8,4^*$
Ureia (U/dL)	$40,4 \pm 4,6$	$39,8 \pm 4,8$
Biomarcadores urinários		
Proteínas totais (mg/dL)	$0,1 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,0$
Creatinina (U/dL)	$12,5 \pm 1,1$	$15,9 \pm 1,9$

Tabela 2. Avaliação por peso e resultados para dosagens bioquímicas em amostras de soro e urina. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$, periodontite versus grupo controle. # Glicose aleatória no sangue.

5.5 Níveis de GSH e MDA renais

Estresse oxidativo nos rins, avaliado pelas concentrações de GSH, demonstrou que animais com periodontite experimental apresentaram 46,2% de redução no conteúdo de GSH renal em comparação aos controles (controle, $467,0 \pm 44,8 \mu / g$ de tecido; periodontite, $256,2 \pm 76,4 \mu / g$ de tecido, $P < 0,05$) (Figura 10A).

A peroxidação lipídica no tecido renal, como demonstrado pelas concentrações de MDA, o grupo periodontite apresentou valores significativamente maiores (controle, $148,5 \pm 29,8 \text{ mmol} / g$ de tecido; periodontite, $395,6 \pm 100,4 \text{ mmol} / g$ de tecido, $P < 0,05$) em comparação com o grupo controle (Figura 10B), correspondendo a um aumento de 266% na peroxidação lipídica nos rins dos animais com a doença.

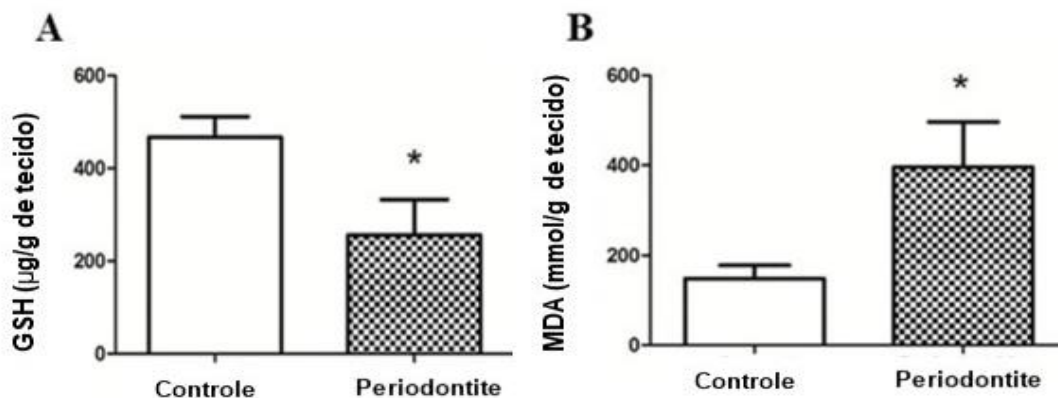


Figura 10. Representação dos resultados para concentração de GSH (A) e MDA (B) no tecido renal. * $p < 0,05$.

5.6 Avaliação histológica e histomorfométrica do tecido renal

Não houveram alterações histológica significativas nos rins do grupo controle (Figura 11A, 11C). Em contraste, os rins avaliados no grupo periodontite, observou-se alterações morfológicas em determinadas regiões como: córtex renal, presença de congestionamento peritubular e glomerular, alargamento do espaço capsular de Bowman, leve degeneração tubular e esfoliação do revestimento de células epiteliais tubulares proximais (Figura 11B, 11D).

Nas lâminas coradas com PAS, uma forte reação foi visualizada na borda em escova e membrana basal dos túbulos renais na camada parietal da capsula de Bowman em animais controle (Figura 11E). Por outro lado, o grupo periodontite demonstrou uma fraca reação para PAS na borda em escova e membrana basal dos túbulos renais (Figura 11F), alterações de borda em escova revelaram perda completa ou parcial nesta região em animais com periodontite (Figura 11F).

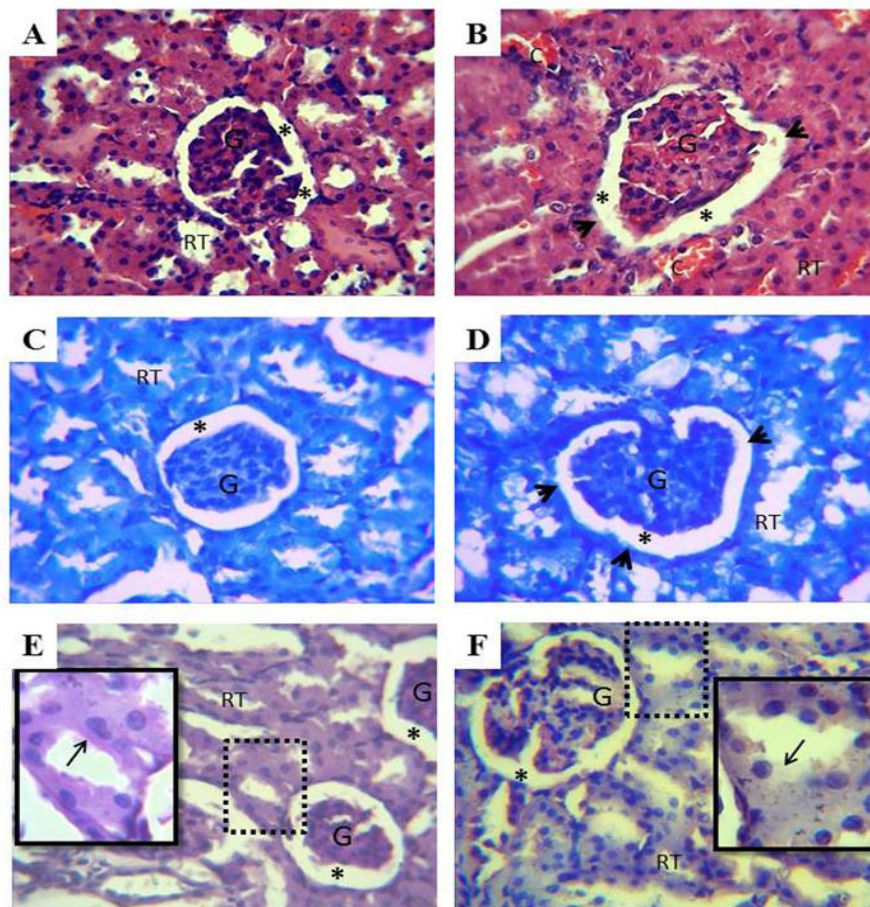


Figura 11. Corte histológico dos rins dos animais, sendo observado grupo controle na coluna da esquerda e grupo periodontite na coluna da direita. (A) morfologia renal grupo do controle com glomérulo (G), túbulos renais, espaço capsular de Bowman (*) (HE). (B) Aumento do tamanho do corpúsculo renal, espaço capsular de Bowman (*), circunferência e diâmetro da cápsula de Bowman (ponta da seta), glomérulo (G) e congestão peritubular são representados pela letra C (HE). Representação histológica do grupo controle corado com azul de toluidina (C) e grupo periodontite com alterações histológicas com aumento da circunferência e diâmetro da cápsula de Bowman (ponta da seta) e do glomérulo (G), corados com azul de toluidina. Corte histológico do grupo controle com forte reação positiva para PAS na borda em escova dos túbulos renais (seta), observado no zoom no retângulo (E) e grupo periodontite com fraca reação PAS na borda em escova dos túbulos renais (seta), demonstrando ruptura desta estrutura, zoom no retângulo (F). Ácido periódico Schiff (PAS); hematoxilina e eosina (HE); Todas as imagens estão em ampliação original de 600X.

Em relação à histomorfometria renal, foram observadas diferenças significativas em todos os parâmetros avaliados, como visto na Figura 12. A circunferência média da cápsula de Bowman do grupo periodontite foi 26,7% maior quando comparado ao grupo controle (grupo controle, $399,6 \pm 13,4 \mu\text{m}$, grupo periodontite, $506,5 \pm 24,1 \mu\text{m}$, $P < 0,05$, Figura 12A). A área corpuscular renal do grupo experimental demonstrou valores significativamente maiores (26,1%) que o grupo controle (grupo controle, $970,6 \pm 32,5 \mu\text{m}^2$, grupo periodontite, $1.224,0 \pm 58,3 \mu\text{m}^2$, $P < 0,05$, Figura 12B), espaço capsular de Bowman, 64,9% (grupo controle, $32,2 \pm 1,4 \mu\text{m}$, grupo periodontite, $53,1 \pm 2,0 \mu\text{m}$, $P < 0,05$, Figura 12C, circunferência glomerular, 18,4% (grupo controle, $362,1 \pm 17,5 \mu\text{m}$, grupo periodontite, $428,4 \pm 3,5 \mu\text{m}$, $P < 0,05$, Figura 12D), diâmetro glomerular, 18,3% (grupo controle, $97,9 \pm 4,7 \mu\text{m}$, grupo periodontite, $115,9 \pm 0,9 \mu\text{m}$, $P < 0,05$, figura 12E) e volume glomerular, 22,2% (grupo controle, $0,9 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \mu\text{m}^3$, grupo periodontite, $1,1 \pm 0,1 \cdot 10^{-6} \mu\text{m}^3$, $P < 0,05$, Figura 12F).

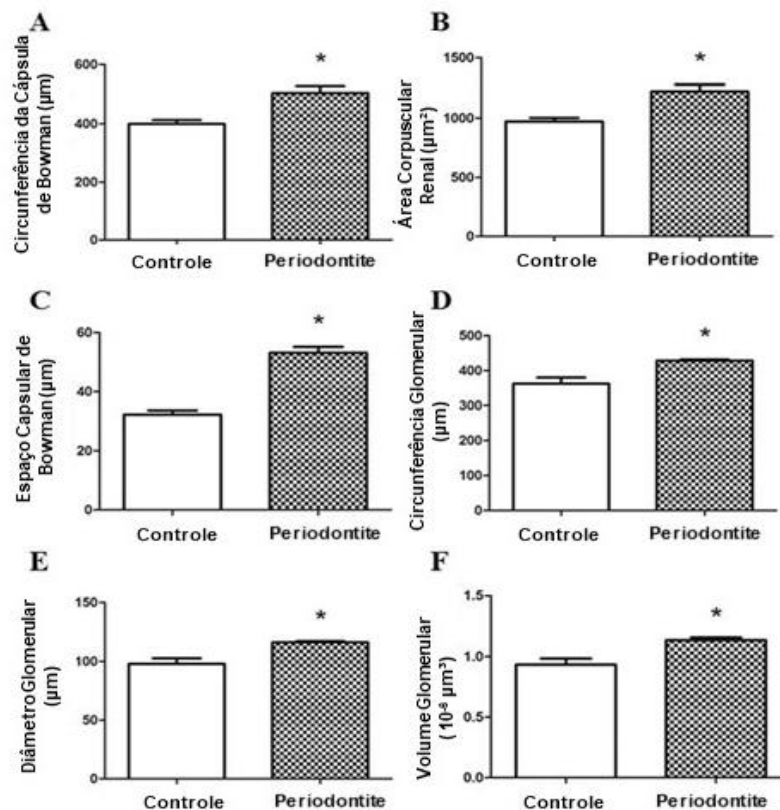


Figura 12. Histomorfometria renal para parâmetros como circunferência da cápsula de Bowman (A), área corpuscular renal (B), espaço capsular de Bowman (C), circunferência glomerular (D), diâmetro glomerular (E) e volume glomerular (F). * $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo na literatura demonstrando o desenvolvimento de alterações histológicas no tecido renal associadas ao aumento do estresse oxidativo e peroxidação lipídica em animais com periodontite. Observou-se redução significativa das concentrações de GSH e aumento de MDA nos rins do grupo periodontite em comparação ao grupo controle saudável, embora nossos dados não tenham demonstrado alterações significativas nos biomarcadores de função renal.

Algumas alterações foram encontradas no tecido renal onde mudanças estruturais nos corpúsculos renais foram confirmadas por alterações na histomorfometria e aumento significativo em todas estruturas avaliadas (variando de 18,3% a 64,9%), como visto em: circunferência da cápsula de Bowman, área corpuscular renal, espaço capsular de Bowman, circunferência capsular de Bowman, diâmetro e volume glomerular. Corroborando os achados de Pontes Andersen et al. (2008) que evidenciou uma tendência ao aumento do volume glomerular em ratos pré-diabéticos com periodontite ($P > 0,05$), contudo nossos dados trouxeram resultados significativos.

Este fato pode ser explicado pelo reduzido número amostral de animais utilizados por esse estudo, que não permitiu detectar mudanças sutis no tecido renal. Ainda, outra razão para explicar a falta da associação significativa entre a periodontite e alterações histológicas (como volume glomerular) é a diferença na fisiologia renal entre machos e fêmeas (DUAN et al., 2016).

Uma investigação em camundongos demonstrou que o dimorfismo sexual estaria diretamente relacionado à periodontite, onde fêmeas desenvolviam a doença em uma taxa de progressão mais elevada do que os machos (DUAN et al., 2016). Ainda, este dimorfismo é de origem morfológica, tendo os machos estruturas glomerulares maiores para filtrar elevadas quantidades de proteínas que as fêmeas. Assim as ratas demonstram maior suscetibilidade a danos renais (IMAFIDON et al. 2016). Devido a este fato, realizamos nossos experimentos em fêmeas.

Outro objetivo do nosso estudo foi usar vários parâmetros histomorfométricos (GUNDERSEN et al., 1988; IMAFIDON et al., 2016) e histológicos, como a coloração por PAS, para confirmar as alterações nos tecidos renais. A análise histológica nos rins é usada para detectar quaisquer alterações (SADEK et al., 2013) e nossos resultados demonstraram que o desenvolvimento e a progressão de periodontite causaram alterações histológicas e histomorfométricas no tecido renal.

Diante da avaliação histológica, o grupo periodontite apresentou rins com alterações morfológicas no córtex renal em regiões peritubulares e glomerulares observadas pela presença de congestão e esfoliação do revestimento das células epiteliais tubulares proximais. Isto foi principalmente em relação aos túbulos renais quando visualizados com coloração de PAS, que revelou ruptura da borda em escova no grupo periodontite com perda completa ou parcial na maioria dos túbulos renais observados.

Um achado ainda mais interessante é o fato de que, apesar dessas alterações histológicas, não foram capazes de causar alterações significativas no peso corporal e renal. Da mesma forma, os biomarcadores sorológicos não apresentaram diferenças significativas para albumina, creatinina, glicose, uréia entre os grupos. Estes resultados corroboram com estudos anteriores em animais com periodontite (VASCONCELOS et al., 2017; CARVALHO et al., 2017).

Para os biomarcadores urinários, os dados não apresentaram diferenças significativas para proteínas totais e creatinina, corroborando com Han et al. (2013) que avaliou tais parâmetros em adultos coreanos com periodontite. Estes achados devem ser avaliados com cuidado, visto que a periodontite pode causar alterações no fígado (TOMOFUJI et al., 2011) e este é o principal órgão responsável pela produção de proteínas no sangue (LEBENSZTEJN et al., 2016).

O único biomarcador sorológico, com diferença significativa, foi o colesterol total, com um aumento de 56,5% no grupo periodontite. Essa descoberta está de acordo com vários outros estudos encontrados na literatura científica (GRIFFITHS; BARBOUR 2010; LUO et al., 2016). Embora as patogenias das alterações renais sejam complexas, níveis alterados de colesterol no soro

estão associados a indutores críticos de dano renal (JOLEES et al., 2000; MUREA et al., 2010) e a periodontite causou essa alteração, conforme nossos dados. Além do mais, tem sido comprovado haver reversibilidade no colesterol total após remoção da ligadura em animais com a doença periodontal (CARVALHO et al., 2017).

As mudanças no perfil lipídico são influenciadas pela peroxidação lipídica (LUO et al., 2016), isso foi demonstrado em nosso estudo pelas concentrações de MDA nos tecidos renais. Uma associação foi previamente relatada entre MDA hepático e periodontite em ratas (TOMOFUJI et al., 2008), que foi reversível após remoção da ligadura (CARVALHO et al., 2017). Desta forma, encontrou-se níveis elevados de MDA renal no grupo periodontite, sendo relatado pela primeira vez na literatura científica. Tais resultados são comuns em casos de tecidos que apresentam alterações morfológicas (NASR; SALEH, 2014).

A peroxidação lipídica produzida pela inflamação periodontal, difunde-se via corrente sanguínea (SOBANIEC; SOBANIEC-LOTOWSKA, 2000; NGUYEN et al., 2016) causando danos em vários órgãos, como coração, fígado, cérebro e rins (TOMOFUJI et al., 2011). Nossos dados corroboram esses achados para tecidos renais. Além do aumento dos níveis de MDA renal, observamos redução significativa de 46,2% no conteúdo de GSH nos rins de animais com periodontite. Achado semelhante foi observado em pacientes com a doença (PANJAMURTHY, 2005).

Outros estudos demonstraram que o tratamento periodontal aumenta os níveis de GSH no fluido crevicular, saliva e periodonto (TONGUÇ et al., 2011; HENDEK et al., 2015; PALWANKAR et al., 2015). A ligação entre estresse oxidativo e inflamação tecidual é mais estudada do que a relação entre periodontite e níveis de marcadores de estresse oxidativo em outros órgãos, demonstrando possíveis danos sistêmicos da periodontite visto que, para essa avaliação, o modelo animal pode ser amplamente empregado. Diante disso, nossos resultados mostram pela primeira vez que a periodontite pode reduzir os níveis renais de GSH.

É importante destacar que a periodontite experimental difere da humana. Na periodontite experimental, a inflamação é rápida no início e altamente destrutiva para os tecidos, evidenciada por perda óssea significativa em 20 dias (DA SILVA et al., 2018.) ou menos (LEITÃO et al., 2005). Portanto, é realmente um modelo de inflamação oral aguda significativa e seria de se esperar que houvesse efeitos a cargo da inflamação e presença do fio de ligadura durante o período experimental (TOMOFUJI et al., 2008). Assim, a interação entre periodontite e alterações no tecido renal devem ser vistas com cautela em modelos de periodontite induzida por fio de ligadura.

Para melhor esclarecer esta relação, possíveis estudos podem ser realizados como a utilização de cargas de LPS para induzir o modelo de periodontite sem a utilização da ligadura, evitando assim, o viés inflamatório exacerbado causado pelo estresse dos dentes ligados durante o período experimental ou até mesmo avaliar as estruturas renais após a remoção da ligadura nestes animais.

7 CONCLUSÃO

A periodontite induzida por ligadura causou alterações histológicas e histomorfométricas nos tecidos renais evidenciadas pelo aumento de estruturas como: circunferência da cápsula de Bowman, área corpuscular renal, espaço capsular de Bowman, circunferência capsular de Bowman, diâmetro glomerular, volume glomerular e ruptura da borda em escova nos túbulos renais de animais com periodontite, podendo estar associadas ao aumento do estresse oxidativo no tecido renal observado pelo aumento das concentrações de MDA e redução de GHS no grupos com a doença periodontal. No entanto, tais alterações não foram suficientes para causar diferenças nos marcadores de função renal.

REFERÊNCIAS

- ABE, T.; HAJISHENGALLIS, G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. **Journal of immunological methods**, v. 394, n. 1-2, p. 49-54, 2013.
- ALI, J. et al. Autoimmune responses in periodontal diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 7, p. 426-431, 2011.
- AMAYA, M. P. et al. Polymorphism of pro-inflammatory cytokine genes and the risk for acute suppurative or chronic nonsuppurative apical periodontitis in Colombian population. **Internacional Endodontic Journal**, v. 46, n. 1, p. 71-78, 2013.
- ANDIA, D. C. et al. Genetic analysis of the IL8 gene polymorphism (rs4073) in generalized aggressive periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v. 58, n. 2, p. 211-217, 2013.
- ARAÚJO, M. G.; SUKEKAVA, F. Epidemiologia da doença periodontal na América Latina. **Periodontia**, v. 17, n. 02, p. 7-13, 2007.
- ARTESE, H. P. C. et al. Effect of non-surgical periodontal treatment on chronic kidney disease patients. **Brazilian Oral Research**, v. 24, n. 4, p. 449-454, 2010.
- AUSAVARUNGNIRUN, R. et al. Association of dental and periodontal disease with chronic kidney disease in patients of a single, tertiary care centre in Thailand. **BMJ open**, v. 6, n. 7, p. e011836, 2016.
- BANSAL, T. et al. C-reactive protein (CRP) and its association with periodontal disease: a brief review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v. 8, n. 7, p. ZE21, 2014.
- BAYRAKTAR, G. et al. Effect of educational level on oral health in peritoneal and hemodialysis patients. **International Journal of Dentistry**, v. 2009, 2009.
- BOYCE, B.F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n. 2, p. 139-146, 2008.
- BORAWSKI, J. et al. The periodontal status of pre-dialysis chronic kidney disease and maintenance dialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 22, n. 2, p. 457-464, 2006.
- BOSSHARDT, D. D. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? **Journal of Dental Research**, v. 84, p. 390-406, 2005.

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

BUDUNELI, N. et al. Saliva concentrations of RANKL and osteoprotegerin in smoker versus non-smoker chronic periodontitis patients. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35, n. 10, p. 846-852, 2008.

BUDUNELI, N.; KINANE, D. F. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. s11, p. 85-105, 2011.

BUHL, E. S. et al. Long-term AICAR administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in rats displaying features of the insulin resistance syndrome. **Diabetes**, v. 51, n. 7, p. 2199-2206, 2002.

CARDOSO, C. R. et al. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 24, p.1-6, 2009.

CARVALHO, J. S. et al. Steatosis caused by experimental periodontitis is reversible after removal of ligature in rats. **Journal of Periodontal Research**, v.00 p. 1-09, 2017.

CARVALHO, R. R. et al. Effect of mangiferin on the development of periodontal disease: involvement of lipoxin A4, anti-chemotaxic action in leukocyte rolling. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, n. 2-3, p. 344-350, 2009.

CAÚLA, A. L et al. Serum creatinine and alkaline phosphatase levels are associated with severe chronic periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 50, n. 6, p. 793-797, 2015.

CAVALLA, F. et al. Cytokine networks regulating inflammation and immune defense in the oral cavity. **Current Oral Health Reports**, v. 1, n. 2, p. 104-113, jun. 2014.

CIRANO, F. R. et al. Effect of resveratrol on periodontal pathogens during experimental periodontitis in rats. **Brazilian oral research**, v. 30, n. 1, 2016.

CHAPPLE, L.L.C; GENCO, R. WORKING GROUP 2 OF THE JOINT EFP/AAP WORKSHOP. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, p. S106-S112, 2013.

CHAMBRONE, L.; LIMA, L. A. P. A.; CHAMBRONE, L. A. Prevalência das doenças periodontais no Brasil. Part II. 1993-2003 **Odonto**, v. 16, n. 31, p. 69-76, 2008.

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, L. P. et al. Does periodontitis reflect inflammation and malnutrition status in hemodialysis patients? **American Journal of Kidney Diseases**, v. 47, n. 5, p. 815-822, 2006.

CHEN, L. P. et al. Relationship between periodontal disease and mortality in patients treated with maintenance hemodialysis. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 57, n. 2, p. 276-282, 2011.

CHERIAN, G. Harvesting cementum from root surface: A new paradigm in the study of cementum and the cemento-dentinal junction. **Journal of Advanced Oral Research**, v. 2, n. 2, p. 17-20, 2011.

CHONCHOL, M. et al. Association of inflammation with anaemia in patients with chronic kidney disease not requiring chronic dialysis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 23, n. 9, p. 2879-2883, 2008.

DA SILVA, F. R. P. et al. Polymorphisms in interleukins 17A and 17F genes and periodontitis: results from a meta-analysis. **Molecular Biology Reports**, p. 1-11, 2017.

DA SILVA, F. R. P. et al. Association between the rs1143634 polymorphism in interleukin-1B and chronic periodontitis: Results from a meta-analysis composed by 54 case/control studies. **Gene**. V. 668, p. 97-106, 2018.

DA SILVA, F. R. P. et al. One or two ligatures inducing periodontitis are sufficient to cause fatty liver. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal. Ed. inglesa**, v. 23, n. 3, p. 4, 2018.

DAVEY, M. W. et al. High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 347, n. 2, p. 201-207, 2005.

DELAMARCHE, P. et al. **Anatomia, fisiologia e biomecânica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006.

DUAN, X. et al. Sex dimorphism in periodontitis in animal models. **Journal of Periodontal Research**, v. 51, n. 2, p. 196-202, 2016.

ECKARDT, K. U. et al. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. **The Lancet**, v. 382, n. 9887, p. 158-169, 2013.

ELTAS, A.; USLU, M. Ö. Evaluation of oral health-related quality-of-life in patients with generalized aggressive periodontitis. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 71, n. 3-4, p. 547-552, 2013.

EKE, P. I. et al. Periodontitis in US Adults: National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2014. **The Journal of the American Dental Association**, v. 149, n. 7, p. 576-588. e6, 2018.

EKE, P. I. et al. Prevalence of periodontitis in adults in United States: 2009 and 2010. **Journal of Dentistry Research**, v. 91, n. 10, p. 914-920, 2012.

FOSTER, B. L. et al. Advances in defining regulators of cementum development and periodontal regeneration. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 78, p. 47-126, 2007.

FOSTER, B. L. et al. Deficiency in acellular cementum and periodontal attachment in bsp null mice. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 2, p. 166-172, 2013.

FU, Y.W. et al. Effects of periodontal therapy on serum lipid profile and proinflammatory cytokines in patients with hyperlipidemia: a randomized controlled trial. **Clinical Oral Investigations**, v. 20, n. 6, p. 1263-1269, 2016.

GALVÃO, A. L. B. et al. Obstrução uretral em gatos machos—revisão literária. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2010.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 443.

GENCO, R. J.; BORGNACKE, W. S. Risk factors for periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 62, n. 1, p. 59-94, 2013.

GRAUBALLE, M. B. et al. Effects of TNF- α blocking on experimental periodontitis and type 2 diabetes in obese diabetic Zucker rats. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 42, n. 9, p. 807-816, 2015.

GRIFFITHS, R.; BARBOUR, S. Lipoproteins and lipoprotein metabolism in periodontal disease. **Clinical Lipidology**, v. 5, n. 3, p. 397-411, 2010.

GUNDERSEN, H. J. G. et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **Apmis**, v. 96, n. 7-12, p. 857-881, 1988.

HAN, S. S. et al. Correlation between periodontitis and chronic kidney disease in Korean adults. **Kidney Research and Clinical Practice**, v. 32, n. 4, p. 164-170, 2013.

HENDEK, M. K. et al. Effect of initial periodontal therapy on oxidative stress markers in gingival crevicular fluid, saliva, and serum in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 86, n. 2, p. 273-282, 2015.

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. 1, p. 5238-5245, 2007.

HOFBAUER, L. C.; SCHOPPER, M. Osteoprotegerin gene polymorphism and the risk of osteoporosis and vascular disease. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, p. 4078-4079, 2002

IMAFIDON, E. C.; AKOMOLAFE, R. O.; OLADELE, A. A. Sexually dimorphic proteinuria in Wistar rats: relevance to clinical models. **Pathophysiology**, v. 23, n. 1, p. 51-59, 2016.

IZQUIERDO-LAHUERTA, A.; MARTÍNEZ-GARCÍA, C.; MEDINA-GÓMEZ, G. Lipotoxicity as a trigger factor of renal disease. **Journal of Nephrology**, v. 29, n. 5, p. 603-610, 2016.

JOLES, J. A. et al. Early mechanisms of renal injury in hypercholesterolemic or hypertriglyceridemic rats. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, n. 4, p. 669-683, 2000.

JÖNSSON, D. et al. The human periodontal ligament cell: a fibroblast-like cell acting as an immune cell. **Journal of Periodontal Research**, v. 46, p. 153-157, 2011.

JUC, R. U.; COLOMBARI, E.; SATO, M. A. Importância do sistema nervoso no controle da micção e armazenamento urinário. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v. 36, n. 1, 2011.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 368.

KAPELLAS, K. et al. Periodontal and chronic kidney disease association: a systematic review and meta-analysis. **Nephrology**, 2018.

KASSEBAUM, N. J. et al. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 11, p. 1045-1053, 2014.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e Biologia celular: uma introdução à Patologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 629, 2016.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.

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.

KOVESDY, C. P. Rate of kidney function decline associates with increased risk of death. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 21, n. 11, p. 1814-1816, 2010.

LEBENSZTEJN, D. M. et al. Hepatokines and non-alcoholic fatty liver disease. **Acta Biochimica Polonica**, v. 63, n. 3, 2016.

LEE, J. H; PRYCE, B. A.; SCHWEITZER, R.; RYDER, M. I. Differentiating zones at periodontal ligament-bone and periodontal ligament-cementum entheses. **Journal of Periodontal Research**, 2015.

LEITÃO, R. F. C. et al. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of periodontology**, v. 76, n. 6, p. 956-963, 2005.

LI, G. et al. Tooth Regeneration: Dentin Regeneration, Periodontal Ligament Regeneration, Dental Pulp Regeneration. **Mesenchymal Stem Cells and Craniofacial Regeneration**, p. 349, 2016.

LIN, C. et al. Dental implants with the periodontium: a new approach for the restoration of missing teeth. **Medical Hypotheses**, v. 72, n. 1, p. 58-61, 2009.

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**. 18(3), BR95, 2012.

LIU, Y. C. G.; LERNER, U. H.; TENG, Y. T. A. Cytokines responses against periodontal infection: protective and destructive roles. **Periodontology 2000**, v. 52, p. 163-206, 2010.

LOWE, J. S.; ANDERSON, P. G. **Stevens & Lowe's Human Histology**. 4.ed. Philadelphia: Elsevier, Mosby, 2015. pp. 295-296.

LUO, S. et al. Periodontitis contributes to aberrant metabolism in type 2 diabetes mellitus rats by stimulating the expression of adipokines. **Journal of Periodontal Research**, v. 51, n. 4, p. 453-461, 2016.

MARCACCINI, A. M. et al. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 37, n. 2, p. 180-190, 2010.

MCCORMACK, Steven W. et al. The biomechanical function of periodontal ligament fibres in orthodontic tooth movement. **Plos one**, v. 9, n. 7, p. e102387, 2014.

MIRICESCU, D. et al. Salivary biomarkers: relationship between oxidative stress and alveolar bone loss in chronic periodontitis. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 72, n. 1, p. 42-47, 2014.

MORADI, J. et al. Anethole, a medicinal plant compound, decreases the production of pro-inflammatory TNF- α and IL-1 β in a rat model of LPS-induced periodontitis. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 13, n. 4, p. 1319, 2014.

MORI, G. et al. The interplay between the bone and the immune system. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, 2013.

MUREA, M. et al. Lipotoxicity in diabetic nephropathy: the potential role of fatty acid oxidation. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, n. 12, p. 2373-2379, 2010.

NASSER, K. R. P.; SOUZA, D. M. Relação entre características mucogengivais e ocorrência de recessão gengival. **Brazilian Journal of Periodontology**, v. 22, n. 4, p. 72-78, 2012.

NASR, A. Y.; SALEH, H. A. M. Aged garlic extract protects against oxidative stress and renal changes in cisplatin-treated adult male rats. **Cancer Cell International**, v. 14, n. 1, p. 92, 2014.

NEWMAN, M. G. et al. **Carranza's Clinical Periodontology**. Elsevier health sciences, 2011.

NIBALI, L. et al. Association between periodontitis and common variants in the promoter of the interleukin-6 gene. **Cytokine**, v. 45, p. 50-54, 2009.

NGUYEN, T. T. et al. Salivary lipid peroxidation in patients with generalized chronic periodontitis and acute coronary syndrome. **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 2, p. 134-141, 2016.

OFFENBACHER, S. et al. Periodontal disease at the biofilm–gingival interface. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 10, p. 1911-1925, 2007.

OHKI, T. et al. Detection of periodontal bacteria in thrombi of patients with acute myocardial infarction by polymerase chain reaction. **American heart journal**, v. 163, n. 2, p. 164-167, 2012.

OLIVEIRA, R. R. D. S. et al. Levels of candidate periodontal pathogens in subgingival biofilm. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 6, p. 711-718, 2016.

PALWANKAR, P. et al. Evaluation of non-surgical therapy on glutathione levels in chronic periodontitis. **European Journal of Dentistry**, v. 9, n. 3, p. 415, 2015.

PANJAMURTHY, K. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. **Cell Mol Biol Lett**, v. 10, n. 2, p. 255-64, 2005.

PENTON, A. et al. Abstract WP170: **Chronic Kidney Disease as a Risk Factor for Enlarged Perivascular Spaces, and Relation to Racial Group**. 2018.

PÉREZ-SAYÁNS, M. et al. RANK/RANKL/OPG role in distraction osteogenesis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 109, n. 5, p. 679-686, 2010.

PINTO, M. C. S. efeitos dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha gracilaria caudata em ratos em um modelo de indução de periodontite por fio de ligadura. 2016.

PONTES ANDERSEN, C. C. et al. Periodontitis deteriorates metabolic control in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. **Journal of periodontology**, v. 77, n. 3, p. 350-356, 2006.

PONTES ANDERSEN, C. C. et al. Renal alterations in prediabetic rats with periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 4, p. 684-690, 2008.

PRANCKEVICIENE, A. et al. Severity of periodontal disease in adult patients with diabetes mellitus in relation to the type of diabetes. **Biomedical Papers**, v. 158, n. 1, p. 117-123, 2014.

RAMS, T. E.; LISTGARTEN, M. A.; SLOTS, J. Radiographic alveolar bone morphology and progressive periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 89, n. 4, p. 424-430, 2018.

RATLIFF, B. B. et al. Oxidant mechanisms in renal injury and disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 25, n. 3, p. 119-146, 2016.

REICHERT, S. et al. Individual composition of human leukocyte antigens and periodontopathogens in the background of periodontitis. **Journal of periodontology**, v. 84, n. 1, p. 100-109, 2013.

REVELES, A. G.; TAKAHASHI, R. T. Health education to ostomy patients: a bibliometrics study. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 41, n. 2, p. 245-250, 2007.

RUSSELL, M. et al. Determining myeloperoxidase activity and protein concentration in a single assay: Utility in biomarker and therapeutic studies. **Journal of Immunological Methods**, v. 449, p. 76-79, 2017.

SADEK, E. M. et al. Histological study on effect of mesenchymal stem cell therapy on experimental renal injury induced by ischemia/reperfusion in male albino rat. **International Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 1, p. 55, 2013.

SANATKHANI, S.; SAIDI, M. S.; BANAZADEH, M. H. Urine concentrating mechanism modelling in rat kidney inner medulla. In: **Biomedical Engineering and 2016 1st International Iranian Conference on Biomedical Engineering (ICBME), 2016 23rd Iranian Conference on**. IEEE, 2016. p. 111-116.

SARAN, R. et al. **US Renal Data System 2017 Annual Data Report: epidemiology of kidney disease in the United States**. 2018.

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.

SESSO, R. C. C. et al. Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2013-Análise das tendências entre 2011 e 2013. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 2014.

SHAO, M. et al. Interleukin-6 polymorphism modify the risk of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 10, n. 2, p. 920-927, 2009.

SHARMA, P. et al. The periodontal health component of the Renal Impairment In Secondary Care (RIISC) cohort study: a description of the rationale, methodology and initial baseline results. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 41, n. 7, p. 653-661, 2014.

SHARMA, V. et al. Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 745, n. 1, p. 84-91, 2012.

SILVA, F. R. P. et al. Relationship between -889 C/T polymorphism in interleukin-1A gene and risk of chronic periodontitis: Evidence from a meta-analysis with new published findings. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal**, v.01, p. 07-14, 2015.

SOBANIEC, H.; SOBANIEC-LOTOWSKA, M. E. Morphological examinations of hard tissues of paradontium and evaluation of selected processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis. **Medical Science Monitor**, v. 6, n. 5, p. 875-881, 2000.

SOUZA FILHO, M. D. et al. Orabase formulation with cashew gum polysaccharide decreases inflammatory and bone loss hallmarks in experimental periodontitis. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, p. 1093-1101, 2018.

STASI, A. et al. Emerging role of Lipopolysaccharide binding protein in sepsis-induced acute kidney injury. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 32, n. 1, p. 24-31, 2016.

SUSIN, C.; HAAS, A. N.; ALBANDAR, J. M. Epidemiology and demographics of aggressive periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 65, n. 1, p. 27-45, 2014.

SZAROMA, W.; DZIUBEK, K. Changes in the amount of reduced glutathione and activity of antioxidant enzymes in chosen mouse organs influenced by zymosan and melatonin administration. **Acta Biologica Hungarica**, v. 62, n. 2, p. 133-141, 2011.

THEOLEYRE, S. et al. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 15, n. 6, p. 457-475, 2004.

THORMAN, R.; NEOVIUS, M.; HYLANDER, B. Clinical findings in oral health during progression of chronic kidney disease to end-stage renal disease in a Swedish population. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, v. 43, n. 2, p. 154-159, 2009.

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. Relationships between periodontal inflammation, lipid peroxide and oxidative damage of multiple organs in rats. **Biomedical Research**, v. 32, n. 5, p. 343-349, 2011.

TONETTI, M. S.; DYKE, T. E. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, n. s14, 2013.

TONGUÇ, M.Ö. et al. The impact of smoking status on antioxidant enzyme activity and malondialdehyde levels in chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 82, n. 9, p. 1320-1328, 2011.

TRIVEDI, S. et al. Association of salivary lipid peroxidation levels, antioxidant enzymes, and chronic periodontitis. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 35, n. 2, 2015.

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

UM, Y. J. et al. The influence of diabetes mellitus on periodontal tissues: a pilot study. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 40, n. 2, p. 49-55, 2010.

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

VASCONCELOS, D.F.P. et al. Effects of simultaneous nicotine and alcohol use in periodontitis progression in rats: A histomorphometric study. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 5, n. 2, p. e95, 2013.

VERDE, M. E. et al. Effect of bisphosphonates on the levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid of patients with periodontal disease and post-menopausal osteoporosis. **Acta Odontológica Latinoamericana**, v. 28, n. 3, p. 215-221, 2015.

WALSH, P. M. B. L. J.; NARAYANAN, A. S. Molecular and cell biology of the gingiva. **Periodontology 2000**, v. 24, p. 28-55, 2000.

WEBSTER, A. C. et al. Chronic kidney disease. **The Lancet**, v. 389, n. 10075, p. 1238-1252, 2017.

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.

ZHAO, D. et al. Evaluation of periodontitis and bone loss in patients undergoing hemodialysis. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 11, p. 1515-1520, 2014.

APÊNDICES e ANEXOS


APÊNDICE I – Artigo Pulicado

Accepted: 9 April 2017
DOI: 10.1111/jcpe.12729

ANIMAL EXPERIMENT

WILEY *Journal of Clinical Periodontology*

Periodontitis changes renal structures by oxidative stress and lipid peroxidation

Luiz Felipe C. França¹ | Any Carolina C. G. Vasconcelos^{1,2} | Felipe R. P. da Silva¹ |
Even H. P. Alves¹ | Joaquina S. Carvalho¹ | David D. Lenardo¹ | Luan K. M. de Souza³ |
André L. R. Barbosa³ | Jand-Venes R. Medeiros³ | Jefferson S. de Oliveira⁴ |
Daniel F. P. Vasconcelos¹ 

¹Laboratory of Histological Analysis and Preparation (LAPHIS), Federal University of Piauí, Parnaíba, PI, Brazil

²Medicine School, Education Institute of Parnaíba Valley (IESVAP), Parnaíba, PI, Brazil

³Laboratory of Experimental Physiopharmacology (LAFEX), Federal University of Piauí, Parnaíba, PI, Brazil

⁴Laboratory of Biology and Biochemistry Plants (BIOqPLANT), Federal University of Piauí, Parnaíba, PI, Brazil

Correspondence

Daniel F. P. Vasconcelos, Universidade Federal do Piauí - UFPI, Campus Ministro Reis Velloso, Reis Velloso, Parnaíba - PI, Brazil.
Email: vasconcelos@ufpi.edu.br

Funding information

Study supported by the Federal University of Piauí (UFPI - Edital PBIC 2014/2015, Edital PBIC 2015/2016 and BIAMA 03/2014), CNPq (455104/2014-0)

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate whether experimental periodontitis cause changes to the renal tissues and imbalance in oxidative stress in kidneys.

Methods: Twenty-two female Wistar rats were separated into two groups: control and periodontitis. We assessed the following parameters: gingival bleeding index (GBI), tooth mobility, gum malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO) activity, probing pocket depth (PPD), alveolar bone loss (ABL) for periodontal tissues; histomorphometric measures associated with renal corpuscle and histopathological aspects (evaluation of brush border) for kidneys; as also blood and urine biomarkers. Finally, we evaluated renal oxidative stress through glutathione (GSH) and MDA respectively.

Results: With regard to renal histomorphometry, significant differences were observed in all parameters assessed. In relation periodic acid Schiff (PAS) staining, disruption was observed of brush border in the periodontitis group in the renal tubules in comparison with the control group. The periodontitis group presented significantly higher MDA and lower GSH concentrations in the kidneys compared with animals without periodontitis.

Conclusion: The induced periodontitis caused histomorphometric changes in renal tissues as well as disruption of the brush border in renal tubules, alterations associated with increase in oxidative stress in kidneys. However, these alterations were not sufficient to cause differences in the renal function markers.

KEYWORDS

bone biology, histochemistry, inflammation, periodontal disease, periodontal medicine

1 | INTRODUCTION

Periodontitis is a destructive disease that causes damage to the periodontal tissues and also various organs (Tomofuji et al., 2007; Tomofuji et al., 2011; Tonetti & Van Dyke, 2013; Vasconcelos et al., 2016). Tissue destruction in periodontitis results from imbalances in inflammatory/

immune response. Epithelial cells of the gums defend the oral mucosa from bacterial invasion, which promotes immune responses (Oliveira et al., 2016) and releases the chemotaxis factor for neutrophils, neutrophil extracellular traps (White, Chicca, Cooper, Milward, & Chapple, 2016) and cytokines (Moretti et al., 2015), perpetuating or exacerbating immune responses. Inopportunely, overproduction of pro-inflammatory

ANEXO A – Aprovação comitê de ética em experimentação animal**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: ceeapi@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 **Ivetete L. de Mendonça**
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora