



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA



JULIANA GOMES GALENO

**ALTERAÇÕES RENAIIS CAUSADAS POR PERIODONTITE INDUZIDA
POR LIGADURA FORAM PERSISTENTES APÓS A REMOÇÃO DAS
LIGADURAS EM RATOS**

Teresina - Piauí

2019



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA



JULIANA GOMES GALENO

**ALTERAÇÕES RENAIIS CAUSADAS POR PERIODONTITE INDUZIDA
POR LIGADURA FORAM PERSISTENTES APÓS A REMOÇÃO DAS
LIGADURAS EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Piauí como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica

Linha de Pesquisa: Ciências Básicas e Biotecnologia Aplicadas à Odontologia

Orientadora: Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos

Teresina-PI

2019

G153a Galeno, Juliana Gomes.
Alterações renais causadas por periodontite induzida por ligadura foram persistentes após a remoção das ligaduras em ratos / Juliana Gomes Galeno. – 2019.
66 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos.
Bibliografia

1. Doença Periodontal. 2. Medicina Periodontal. 3. Doenças Renais. I. Título.

CDD 617.6

**ALTERAÇÕES RENAIAS CAUSADAS POR PERIODONTITE INDUZIDA
POR LIGADURA FORAM PERSISTENTES APÓS A REMOÇÃO DAS
LIGADURAS EM RATOS**

COMISSÃO EXAMINADORA

1) Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos

Titulação: Doutor em Biologia Buco Dental

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof. Dr. Manoel Dias de Souza Filho

Titulação: Doutor em Biotecnologia

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof. Dr. Patrick Veras Quelemes

Titulação: Doutor em Biotecnologia

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Suplente: Prof. Dr. Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar

Titulação: Doutor em Biotecnologia

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Teresina

2019

DEDICATÓRIA

À minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

AGRADECIMENTOS

Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta dissertação se concretizasse.

Em primeiro lugar quero agradecer ao Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos por ter-me deixado fazer parte do seu grupo de trabalho e, ter acreditado em mim e nas minhas capacidades. Agradeço ainda o trato simples, correto e científico, com que sempre abordou as nossas reuniões sem nunca ter permitido que o desalento se instalasse, mesmo quando as coisas não corriam bem. Agradeço-lhe ainda o tema do trabalho, que sempre me aliciou o que fez, na maioria das vezes, conseguir ultrapassar dificuldades surgidas.

Agradeço de igual forma, aos amigos do LAPHIS: David Di Lenardo, Luiz Felipe de Carvalho França, Joaquina dos Santos Carvalho, Even Herlany Pereira Alves, Pedro Henrique Sales de Oliveira, Larissa dos Santos Pessoa, Bruno Almeida Arrais, André dos Santos Carvalho, Hélio Mateus Silva Nascimento, Raissa Silva Bacelar de Andrade, Ayane Araújo Rodrigues. Cada um foi igualmente especial. Agradeço o bom convívio, as boas discussões e a alegria que se instala sempre nesse grupo.

Agradeço à meu amigo querido Felipe Rodolfo Pereira da Silva à amizade demonstrada, à sua sempre inteira disponibilidade, e ainda por me instigar incansavelmente o meu instinto de pesquisadora.

Agradeço à Rogéria Maria Viana Farias e Fernando Rodrigues da Costa “*in memoriam*”, pessoas ímpares que tantas vezes me receberam e me auxiliaram em Parnaíba. Foram sempre carinhosos e cuidadosos.

Agradeço a minha amada família – Mamãe (Regina Celia Gomes), meu filho (Pedro Henrique Galeno Alves) e minha tia (Lúcia Maria Gomes Marque) pelo amor, pelo permanente incentivo e preocupação. Agradeço ainda a paciência e amor demonstrados nos meus momentos “menos bons”.

O maior de todos os agradecidos certamente é para Deus, Meu Senhor, Meu Pai, que concedeu essa oportunidade de vida.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HD – Hemodiálise

DRT – Doença Renal Terminal

ISG – Índice De Sangramento Gengival

MPG – Margem e Papila Gengival

IPS – Índice de Profundidade de Sondagem

MPO – Mieloperoxidase

POA – Perda de Osso Alveolar

MDA – Malonaldeído

GSH – Glutationa Reduzida

PIC – Perda de Inserção Clínica

LPS – Lipopolissacarídeo

RANKL – Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kb

RANK – Receptor Ativador do Fator Nuclear Kb

OPG – Osteoprotegerina

PMN – Polimorfonucleares Neutrófilos

FNT – Fator de Necrose Tumoral

IL – Interleucina

ROR – Receptor Órfão Relacionado ao Receptor do Ácido Retinóico (ROR).

PGE2 – Prostaglandina E2

LPS – Lipopolissacarídeos

ICAM-1 – Molécula De Adesão Celular 1

ERO – Espécies Reativas De Oxigênio

PAgG – Periodontite Agressiva Generalizada

PC – Periodontite Crônica

DRC - Doença Renal Crônica

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura A. Ilustração de um corte longitudinal no sentido antero-posterior demonstrando as estruturas de suporte dental que compreendem o periodonto em um estado saudável e um estado em que se observa a ocorrência de periodontite com acúmulo de placa dental, degradação dos tecidos periodontais e perda óssea alveolar.....	10
Figura B. Ilustração esquemática da localização dos rins no corpo humano (1) com detalhamento das estruturas em que se pode ver o rim seccionado no sentido longitudinal com o córtex e medula exposta e pelve renal (2), o néfron composto da cápsula de Bowman e túbulos contorcidos e coletores, (4) e do glomérulo renal composto das arteríolas aferente e eferente e dos capilares glomerulares no interior da cápsula de Bowman.....	20
Figura C. Secção longitudinal do rim de Rato Wistar do grupo controle, corado pela técnica de hematoxilina e eosina com visualização do glomérulo renal (G) e cápsula de Bowman (C) circundado por túbulos renais.....	21
Figura 1. Resultados de Parâmetros Orais na avaliação da periodontite induzida por ligadura em ratas fêmeas <i>Wistar</i>	33
Figura 2. Resultados das dosagens de maldondialdeído (MDA) e glutathiona (GSH) do Tecido Renal de ratas utilizadas neste estudo para os grupos controle, o grupo periodontite induzida por ligadura e o grupo P20-20 com 20 dias de indução de periodontite e 20 dias de retirada da ligadura.....	37
Figura 3. Imagens do Córtex Renal com Coloração de Hematoxilina - HE e Eosina e Acído Perióxido de Shiff – PAS.....	42
Tabela 1. Parâmetros de Peso e Biomarcadores Sanguíneos (Albumina, Creatinina, Colesterol Total, Nitrogênio Ureico Sanguíneo, Proteínas Totais e Glicemia).....	38
Tabela 2. Avaliação Histomorfométrica dos Rins.....	40

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
REVISAO DA LITERATURA.....	12
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	24
ARTIGO.....	27
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS.....	36
DISCUSSÃO.....	44
CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
APÊNDICE 1 – PRESS RELEASE.....	53
APÊNDICE 2 – PRODUÇÃO INTELECTUAL.....	56
ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	57
ANEXO 2 – NORMAS PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	58

1.RESUMO

Estudos mostraram o papel da periodontite em órgãos de pacientes e em modelos animais. Pesquisas mostraram a reversão de danos no fígado após remoção da ligadura no modelo de indução da doença. O objetivo agora foi avaliar a reversão dos danos renais de animais com periodontite induzida por ligadura. Foram utilizadas 24 ratas Wistar fêmeas divididas em três grupos de 8 animais cada: Controle (sem ligadura por 20 dias), Periodontite (receberam ligadura por 20 dias) e P20-20 (receberam ligadura por 20 dias, a mesma foi removida e os animais foram mantidos por mais 20 dias sem ligadura). A indução ocorreu por inserção de fio de nylon 3-0 ao redor do primeiro molar inferior direito. Após 20 dias de indução os grupos Controle e Periodontite foram avaliados para determinação de parâmetros periodontais (mobilidade dentária, sangramento gengival, perda óssea alveolar e profundidade de sondagem), coleta de sangue pelo plexo orbital e foram eutanasiados com remoção dos rins para avaliação histomorfométrica e histopatológica. Nos animais do grupo P20-20 isso foi realizado após 40 dias. A análise estatística foi realizada por meio do teste de Shapiro-wilk. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. O grupo periodontite e o grupo P20-20 tiveram maiores valores de MDA (malondialdeído) nos tecidos renais e menores valores de GSH (glutathiona reduzida) nesses tecidos. Houve reversibilidade do colesterol para o grupo P20-20 quando comparado ao grupo de periodontite. A quantidade de proteínas totais foi inversamente proporcional à presença de periodontite. Os rins do grupo P20-20 apresentaram alterações semelhantes ao grupo periodontite. As alterações renais causadas pela periodontite induzida por ligadura foram persistentes após a remoção da ligadura em ratos dentro das condições avaliadas.

Palavras-chaves: Doença Periodontal, Medicina Periodontal, Doenças Renais.

2. INTRODUÇÃO

A periodontite é uma inflamação destrutiva crônica nos tecidos ao redor dos dentes (Sete *et al.*, 2016) levando a distúrbios orais, bem como, possíveis alterações em vários órgãos (Tomofuji *et al.*, 2007; Tomofuji *et al.*, 2011; França *et al.*, 2017; Vasconcelos *et al.*, 2018). Fatores estão envolvidos no desenvolvimento da periodontite e no curso da inflamação, como espécies bacterianas, a resposta imune do hospedeiro (Oliveira *et al.*, 2016) e a liberação de fatores de quimiotaxia para células inflamatórias (White *et al.*, 2016). Além disso, a composição da saliva, a herança de polimorfismos genéticos específicos (Silva *et al.*, 2017a; Silva *et al.*, 2017b, Silva *et al.*, 2018), alterações nos vasos sanguíneos ou tecido conjuntivo (Alves *et al.*, 2007), quando as bactérias específicas estão presentes, o hospedeiro inicia uma resposta de defesa com uma perspectiva de sinalização não celular, estimulando os neutrófilos e então as prostaglandinas podem contribuir com a inflamação periodontal (Almeida *et al.*, 2006).

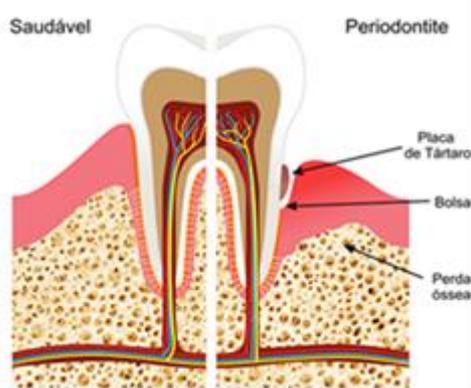


Figura A. Ilustração de um corte longitudinal no sentido antero-posterior demonstrando um dente e suas estruturas de suporte que compreendem o periodonto em um estado saudável e um estado em que se observa a

ocorrência de periodontite com acúmulo de placa dental, degradação dos tecidos periodontais e perda óssea alveolar.

A periodontite pode predispor à doença renal crônica (DRC) da mesma forma que a DRC pode predispor à periodontite, e bactérias associadas à periodontite são consideradas como a fonte da inflamação, o que pode predispor e / ou causar danos renais (Almeida *et al.*, 2011). Um estudo clínico indicou que pacientes com periodontite grave eram propensos à DRC (Ausavarungrun *et al.*, 2016). Outro estudo clínico encontrou maior perda óssea alveolar em pacientes em hemodiálise em comparação com indivíduos controle (Zhao *et al.*, 2014).

A literatura trouxe estudos utilizando modelos animais para periodontite com a avaliação do impacto sistêmico da doença. No entanto, não foi possível identificar a associação exata entre doença renal e periodontite; mesmo com diversos estudos sugerindo uma relação entre as duas condições (Sharma *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014; Grauballe *et al.*, 2017; Ausavarungrun *et al.*, 2016).

Demonstramos anteriormente que a periodontite experimental altera as estruturas renais como resultado do estresse oxidativo, bem como da peroxidação lipídica (França *et al.*, 2017). Outro estudo da nossa equipe de pesquisa demonstrou que a remoção da ligadura em ratos com periodontite experimental, foi capaz de reverter a esteatose hepática causada pela periodontite experimental (Carvalho *et al.*, 2017). No entanto, um estudo que avaliou a reversibilidade das alterações renais após a remoção da ligadura em um modelo experimental de periodontite não estava disponível na literatura até o momento. Portanto, o presente estudo tem como objetivo elucidar essa questão, na qual foi realizada uma periodontite induzida por

ligadura para analisar se as alterações renais causadas pela periodontite podem ser reversíveis após a retirada das ligaduras.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PERIODONTITE

Eke *et al.*, (2012) estudaram a prevalência, a gravidade e a extensão da periodontite na população adulta dos EUA, com dados do Ciclo Nacional de Pesquisa de Saúde e Nutrição de 2009 e 2010. As estimativas foram derivadas de uma amostra de 3.742 adultos com 30 anos ou mais, da população civil não institucionalizada, com um ou mais dentes naturais. Esta pesquisa forneceu evidências diretas de uma alta carga de periodontite na população adulta dos EUA.

Eke *et al.*, (2012) descreveram a prevalência geral de periodontite nas populações. Avaliaram amostra de 456 adultos com idade ≥ 35 anos. A prevalência da periodontite foi significativamente maior nos homens que nas mulheres, maior entre as pessoas com menor status educacional, piorou também com o aumento da pobreza. Em conclusão sugere que a periodontite é um importante problema odontológico de saúde pública e tem um potencial custo econômico para prevenção e tratamento.

Abe e Hajishengallis (2013) apresentaram um método simples para a ligadura do segundo dente molar superior em modelos experimentais animais e, além disso, identificaram os locais mais apropriados para avaliar a perda óssea inflamatória de maneira válida e reprodutível. Foram utilizados camundongos. Também foram identificados uma série de fatores como principais sítios susceptíveis a óssea bem como que a superfície palatina apresenta perda óssea progressiva. Tais dados podem ajudar a padronizar e otimizar o uso do modelo de ligadura-periodontite em ratos.

Eke *et al.*, (2015) determinaram a prevalência, gravidade e extensão da periodontite na população adulta dos EUA. Utilizando dados combinados dos ciclos de 2009 a 2010 e 2011 a 2012 da Pesquisa Nacional de Exame de Saúde e Nutrição. As estimativas foram derivadas de uma amostra de 3.742 adultos com 30 anos ou mais. A periodontite foi mais prevalente em homens, com escolaridade abaixo do ensino médio, abaixo da linha da pobreza e fumantes. Esta pesquisa forneceu evidência direta da considerável prevalência da periodontite na população adulta dos EUA.

Duarte *et al.*, (2015) determinaram por meio de revisão sistemática o risco de indivíduos com periodontite agressiva e periodontite crônica terem um perfil diferente de citocinas/quimiocinas no fluido gengival. Foram selecionados 17 estudos caso-controle relatando os níveis de 21 diferentes citocinas/quimiocinas. Os autores concluíram que o peso atual da evidência não é suficiente para provar que existem perfis distintos de citocinas/quimiocinas no fluido gengival para pacientes com periodontite agressiva e periodontite crônica.

Aimetti *et al.*, (2015) descreveram a prevalência de periodontite e seus indicadores de risco entre adultos de uma área urbana no norte da Itália. Cerca de 1600 indivíduos, com idade entre 20 e 75 anos, foram selecionados aleatoriamente.

As estimativas de prevalência de periodontite grave e moderada foram 34,94% e 40,78%. A probabilidade de periodontite aumentou em fumantes e com a idade. A periodontite foi altamente prevalente na população estudada. Os dados atuais permitirão o desenvolvimento de programas apropriados de saúde pública e a alocação de recursos.

Cifcibasi *et al.*, (2015) determinaram o perfil fenotípico de células mononucleares do sangue, especificamente células CD8 + / CD28 +, em pacientes

com periodontite agressiva generalizada (PAgG) e periodontite crônica (PC) no sangue periférico e no sangue obtido de um local de defeito periodontal que pode contribuir para danos nos tecidos. Treze PAgG, onze PC e cinco controles saudáveis foram incluídos no estudo. Os pacientes com PAgG e CP apresentam níveis aumentados de células T citotóxicas ativadas como resultado de inflamação, que pode causar danos graves nos tecidos que levam à perda grave e rápida de tecidos periodontais.

Hajishengallis (2015) estudou, por revisão, os mecanismos de subversão imune microbiana que inclinam o equilíbrio da homeostase para a doença periodontal em locais orais ou extraorais. Foram utilizados artigos que tinham por tema principal a subversão bacteriana ativa do acolhimento da resposta imune para permitir a persistência dos patógenos no ambiente inflamatório local da periodontite e indução da patologia ou complicações em sítios sistêmicos. A compreensão dos mecanismos da patogênese da periodontite e condições sistêmicas associadas precisa ser integrada com os dados da expressão gênica, bem como com dados de análise do genoma de amostras de tecido de indivíduos saudáveis e de pacientes com diferentes estágios da doença.

Eke *et al.*, (2016) estimaram a prevalência da periodontite entre adultos com idade ≥ 65 anos. Foram analisados os dados dos Inquéritos Nacionais de Saúde e Nutrição do Exame 2009/2010 e 2011/2012. A periodontite é altamente prevalente nesta subpopulação, com dois terços dos idosos afetados em qualquer nível geográfico. Esses achados fornecem uma oportunidade para determinar como o manejo global de saúde de idosos deve considerar a melhoria de suas condições de saúde bucal.

Bakir *et al.*, (2016) determinaram os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da curcumina na periodontite. Foram utilizados 38 ratos Wistar albinos divididos em quatro grupos: 1) periodontite; 2) periodontite com tratamento com curcumina; 3) periodontalmente saudável com tratamento com curcumina; e 4) periodontalmente saudável. A curcumina foi administrada por gavagem oral por 15 dias. Após o sacrifício via exsanguinação, os seguintes níveis séricos foram determinados por meio de ensaio imunoenzimático: IL - 1 β ; IL-6; IL-17A; IL-23; e fator de crescimento transformador β . A curcumina pareceu ser um promissor modulador do hospedeiro na patogênese da doença periodontal em relação ao eixo IL-17/IL-23, com efeito decrescente na perda óssea alveolar e nas expressões gengivais de IL-17 e expressão do fator de transcrição do receptor órfão relacionado ao receptor do ácido retinóico.

3.2 EFEITOS SISTÊMICOS DECORRENTES DA PERIODONTITE

Offenbacher *et al.*, (2009) avaliaram os efeitos do tratamento periodontal como uma intervenção em um modelo de prevenção de evento cardíaco secundário. O estudo randomizou 303 indivíduos com doença periodontal e história prévia de eventos cardiovasculares recentes. Foi realizado protocolo de alisamento radicular para avaliar os efeitos sobre o estado periodontal e os níveis sistêmicos de alta sensibilidade à proteína C reativa - PCR. Os dados sugerem que a terapia periodontal pode reduzir os níveis de PCR-s em pacientes cardiovasculares não obesos. A obesidade atua para aumentar os níveis de PCR e possivelmente anular quaisquer efeitos do tratamento periodontal sobre os níveis de PCR.

Furusho *et al.*, (2013) investigaram os efeitos da infecção dental com *Porphyromonas gingivalis* – P.g. na progressão esteato-hepatite não alcoólica.

Camundongos foram alimentados com dieta de ração ou dieta rica em gordura e então, metade dos camundongos de cada grupo, foram infectados com P.g. na câmara pulpar. A esteatose do fígado desenvolveu-se nos animais da dieta com gordura. Baseados nos achados histopatológicos e na detecção de P.g. em células de *Kupffer* e também nos hepatócitos, os autores concluíram que a infecção dentária por P.g. pode desempenhar um papel importante na progressão da esteato-hepatite não alcoólica.

Bullon, Newman e Baltino (2014) discutiram as crescentes evidências de que a base para as inter-relações entre periodontite crônica e doença ateromatosa e diabetes situam-se em um nível intracelular fundamental. Os critérios utilizados nesta revisão foram aqueles que buscavam evidências de estresse oxidativo e de disfunção mitocondrial de encontro com essas doenças. Os autores concluíram que caso o mecanismo da inflamação fosse modificado ou alterado, este poderia se tornar um mecanismo desencadeante iniciando uma agressão patogênica que poderia explicar o aparecimento de uma doença. O processo de inflamação modificada poderia ser o ponto de encontro para a obesidade, diabetes, aterosclerose e periodontite crônica.

Bokhari *et al.*, (2014) avaliaram a possível associação entre parâmetros clínicos específicos de periodontite e biomarcadores sistêmicos de risco de doença coronariana em pacientes coronariopatas com periodontite. Foram examinados 317 pacientes com doença arterial coronariana angiograficamente comprovada com idade > 30 anos e sem outras doenças sistêmicas. Em pacientes com doença coronariana com periodontite, os parâmetros clínicos periodontais de sangramento à sondagem estão associados aos níveis sistêmicos de proteína C Reativa.

Arimatsu *et al.*, (2014) investigaram se distúrbios da microbiota intestinal por bactérias engolidas induzem uma endotoxemia metabólica levando a distúrbios metabólicos. Para investigar esta hipótese, mudanças na microbiota intestinal, insulina e intolerância à glicose, e os níveis de inflamação tecidual foram analisados em camundongos após a administração oral de *Porphyromonas gingivalis*, um periodontopatógeno representativo. Em camundongos administrados por *P. gingivalis*, os níveis de endotoxina sangüínea tenderam a ser maiores, enquanto a expressão gênica de proteínas de junção estreita (zônulas de oclusão) no íleo foi significativamente diminuída. Esses resultados fornecem um novo paradigma para a inter-relação entre periodontite e doenças sistêmicas.

Ilievski *et al.*, (2016) determinaram os efeitos metabólicos da periodontite no cérebro, fígado, coração e plasma resultantes da periodontite induzida por *P.g.* em camundongos. A periodontite foi induzida pela aplicação oral do periodontopatógeno por 22 semanas. A aplicação oral de *P.g.* induziu periodontite crônica e marcas de pré-diabetes. Os resultados da análise da amostra indicaram mudanças nos metabólitos relacionados ao metabolismo da glicose e arginina, inflamação e homeostase redox. Alterações nos bioquímicos sugeriram efeitos sistêmicos sutis relacionados à doença periodontal, com aumento nos marcadores de inflamação e estresse oxidativo mais proeminentes no fígado. Sinais de alterações na homeostase redox também foram observados no cérebro e no coração. Os ácidos biliares elevados no fígado foram sugestivos de aumento da biossíntese, o que pode refletir alterações na função hepática. Também houve sinais de diminuição da disponibilidade de glicose no cérebro.

Perunovic *et al.*, (2016) avaliaram os níveis de quatro gatilhos laborais principais, prostaglandina E2, interleucina IL-6 e fator de necrose tumoral, em fluido

gengival crevicular e amostras de soro entre mulheres com parto prematuro e parto a termo e correlacioná-los com parâmetros periodontais. Amostras de soro foram coletadas 24 a 48 horas após o parto de 120 mulheres (60 parto prematuro, 60 parto a termo). Mulheres com parto pramaturo demonstraram piores parâmetros periodontais e aumentaram significativamente os níveis do fluido gengival, IL-6 e prostaglandinas quando comparadas com aquelas que tivemos parto a termo.

Da Silva et al., (2017) realizaram uma metanálise com foco em dois polimorfismos (rs2275913 e rs763780) nos genes das interleucinas 17A e 17F, respectivamente, tanto na periodontite crônica (CP) quanto na periodontite agressiva (PAg) para avaliar o impacto da influência da carga genética no desenvolvimento da doença e seus efeitos no organismo. A revisão na literatura para a metanálise foi realizada em várias bases de dados para estudos publicados antes de 25 de setembro de 2016. Os resultados demonstraram a não associação significativa entre os polimorfismos rs2275913 e rs763780 nas interleucinas 17A e 17F e periodontite crônica e agressiva na avaliação alélica evidenciando o papel destas variações genéticas em mediadores inflamatórios e periodontite. Portanto os autores concluíram que tais variantes genéticas não devem ser considerados candidatos a marcadores moleculares para a periodontite, contudo os próprios autores afirmam o número reduzido de estudos inclusos na metanálise como uma importante limitação e que estudos posteriores devem ser realizados para confirmar tais achados.

Vasconcelos *et al.*, (2017) investigaram a associação entre periodontite induzida e dano causado por seus efeitos sistêmicos no fígado. Vinte ratos foram divididos em dois grupos: um grupo controle e um grupo que recebeu indução de periodontite por ligadura na região do primeiro molar inferior direito. Houve um aumento significativo na esteatose microvesicular ($P < 0.05$) acompanhada por uma

redução acentuada nos pericitos identificados por ensaio de imunohistoquímica. Concluíram que havia associação dos efeitos sistêmicos da periodontite induzida com alterações nos tecidos hepáticos, como a esteatose microvesicular, provavelmente causada pelo aumento do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica.

Dos Santos Carvalho *et al.*, (2017) investigaram a hipótese de a esteatose e o estresse oxidativo causado por periodontite experimental induzida em ratos serem reversíveis no fígado. Foram usadas 24 ratos divididas em 3 grupos: controle, periodontite e P20-20 (20 dias com periodontite experimental e 20 dias sem periodontite experimental, para verificar a reversibilidade das lesões hepáticas). Concluíram que a esteatose microvesicular causada por periodontite induzida por ligadura em ratos foi reversível após a remoção da ligadura.

3.3 DANOS AOS TECIDOS RENAI DECORRENTES DE INFLAMAÇÃO

Ichii *et al.*, (2012) determinaram a maior expressão do micro RNA 146a (miR-146a) associada ao desenvolvimento de lesões nas estruturas renais (Figura B). Neste estudo, um modelo de doença renal crônica foi realizado em ratos o qual a maior expressão de miR-146a foi determinada por análise de *microarray*. MiR-146a é um tipo de RNA não codificador altamente conservado que contribui com a expressão de RNA's mensageiros e seu papel biológico pode ser descrito pela interferência no processo inflamatório. Alterações na expressão destes tipos de micro RNA já foram associadas ao risco de diabetes e doenças inflamatórias. O estudo também encontrou o aumento na expressão de genes de citocinas pro-inflamatórias como IL-1B e IL-10.

Terawaki *et al.*, (2014) investigaram o estado atual do estresse oxidativo em pacientes pré-diálise com insuficiência renal. A pesquisa foi feita em 55 pacientes não dialíticos (31 homens e 24 mulheres) com doenças renais crônicas, e com vários graus de função renal. O estresse oxidativo, mesmo antes da diálise, foi aumentado em correlação com o nível de disfunção renal em pacientes com insuficiência renal crônica. Os autores concluíram, então, que deveria haver estratégias antioxidantes como parte do tratamento para insuficiência renal pré-diálise.

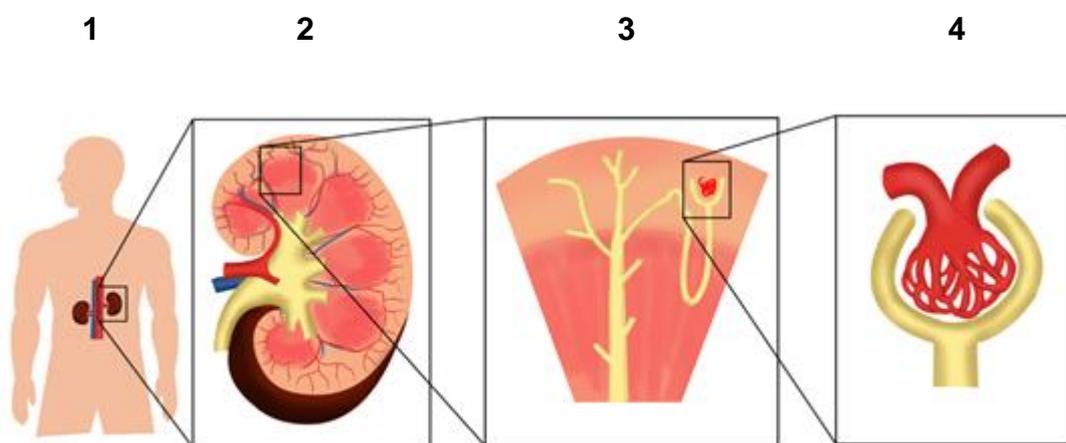


Figura B. Ilustração esquemática da localização dos rins no corpo humano (1) com detalhamento das estruturas em que se pode ver o rim seccionado no sentido longitudinal com o córtex e medula expostos e pelve renal (2), o néfron composto da cápsula de Bowman e túbulos contorcidos e coletores, (4) e do glomérulo renal composto das arteríolas aferente e eferente e dos capilares glomerulares no interior da cápsula de Bowman.

Duong *et al.*, (2017) identificaram que a dor crônica e estresse induzem inflamação renal com possível redução da função filtradora dos rins. Para isso os níveis de interleucina 18 foram analisados por ensaios de imunocitoquímica em animais expostos a dor crônica por injeções repetitivas. Os níveis deste mediador inflamatório foram mais elevados nestes animais do que nos controles.

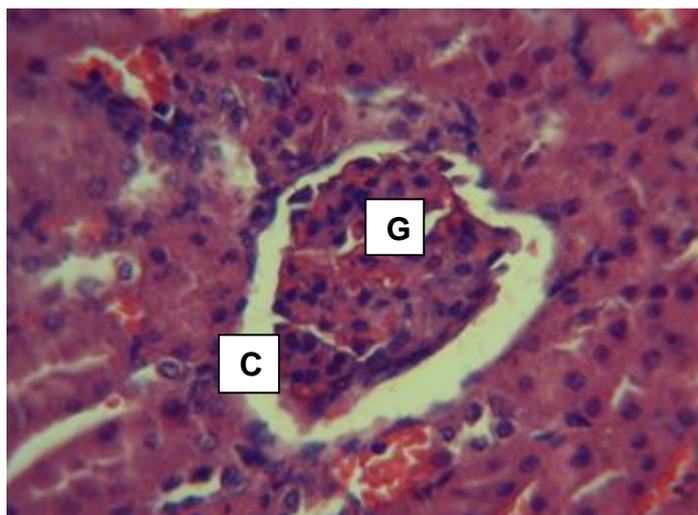


Figura C. Secção longitudinal do rim de Rato Wistar do grupo controle corado pela técnica de hematoxilina e eosina com visualização do glomérulo renal (G) e cápsula de Bowman (C) circundado por túbulos renais.

3.4 DANOS AOS TECIDOS RENAISS ASSOCIADOS A QUADROS DE PERIODONTITE

Fisher *et al.*, (2011) avaliaram o potencial para conexões entre doença renal crônica - DRC e doença periodontal, e mediadores dessas relações usando modelos de equações estruturais de dados de 11.211 adultos com idade ≥ 18 anos que participaram da Terceira Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição. Modelos de regressão logística multivariada foram utilizados para testar a hipótese de que a doença periodontal estava independentemente associada à DRC. Concluíram que

há uma relação bidirecional entre DRC e doença periodontal, mediada pela hipertensão e a duração do diabetes.

Ioannidou e Swede (2011) examinaram a hipótese de que pacientes com doença renal crônica - DRC teriam maior prevalência de periodontite moderada em comparação com indivíduos sem DRC. Usaram o conjunto de dados da Pesquisa Nacional de Exame de Saúde e Nutrição Americana. No geral, 14,6% dos indivíduos com DRC foram classificados como tendo periodontite moderada, em comparação com 8,7% no grupo não-DRC. A prevalência de periodontite entre os participantes com DRC foi substancialmente maior entre negros não hispânicos (38,9%) e mexicanos-americanos (37,3%) em comparação com brancos não-hispânicos (12,9%). Modelos de regressão logística multivariada mostraram que mexicanos-americanos e não-hispânicos negros com DRC tinham aproximadamente 30% a 60% mais chances de ter periodontite moderada em comparação àqueles sem DRC.

Akar et al. (2011) revisaram os fatores etiológicos e potenciais consequências sistêmicas da má saúde bucal em pacientes com doença renal crônica, bem como possíveis estratégias preventivas e terapêuticas. A saúde bucal é freqüentemente ruim em pacientes com doença renal crônica – DRC e pode contribuir para inflamação, infecções e complicações ateroscleróticas, todas elas importantes problemas que justificariam uma maior atenção ao atendimento odontológico e uma melhor conscientização na clínica. Manter uma dentição saudável e funcional na DRC tem um papel adicional complementar que provavelmente excede os benefícios observados na população em geral.

Chambrone et al. (2013) em pesquisa sistemática avaliaram a associação entre periodontite e doença renal crônica e o efeito do tratamento periodontal na

taxa de filtração glomerular estimada. Também realizaram uma meta-análise de efeitos aleatórios para estimar o grau de associação entre periodontite e doença renal crônica. Concluíram haver evidências bastante consistentes para apoiar a associação positiva entre periodontite e doença renal crônica, bem como o efeito positivo da periodontite na taxa de filtração glomerular estimada.

Ausavarungrun et al. (2014) avaliaram a associação entre a formação dentária e as doenças periodontais em pacientes tailandeses com vários estágios da doença renal crônica-DRC. Um total de 129 pacientes com DRC diagnosticada por pelo menos 90 dias com idade maior que 20 anos. As doenças periodontais severas foram mais prevalentes em pacientes com DRC mais grave do que naqueles com DRC menos grave.

França *et al.*, (2017) investigaram se a periodontite experimental causaria alterações nos tecidos renais e desequilíbrio no estresse oxidativo nos rins. Vinte e dois ratos Wistar foram separados em dois grupos: controle e periodontite. Dentre as avaliações foram observados o estresse oxidativo renal através da glutathiona (GSH) e MDA. Concluíram que a periodontite induzida causou alterações histomorfométricas nos tecidos renais bem como a ruptura da borda em escova nos túbulos renais, alterações associadas com aumento no estresse oxidativo em rins.

4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *Journal of immunological methods*. 2013 Aug 30;394(1-2):49-54.

Akar H, Akar GC, Carrero JJ, Stenvinkel P, Lindholm B. Systemic consequences of poor oral health in chronic kidney disease patients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2011 Jan 1;6(1):218-26.

Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Ryder MI, Gotoh K, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Yamazaki K. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Scientific reports*. 2014 May 6;4:4828.

Ausavarungnirun R, Wisetsin S, Rongkiettechakorn N, Chaichalerm Sak S, Udampol U, Rattanasompattikul M. Association of dental and periodontal disease with chronic kidney disease in patients of a single, tertiary care centre in Thailand. *BMJ open*. 2016 Jul 1;6(7):e011836.

Aimetti M, Perotto S, Castiglione A, Mariani GM, Ferrarotti F, Romano F. Prevalence of periodontitis in an adult population from an urban area in North Italy: findings from a cross-sectional population-based epidemiological survey. *Journal of clinical periodontology*. 2015 Jul;42(7):622-31.

Bokhari SA, Khan AA, Butt AK, Hanif M, Izhar M, Tatakis DN, Ashfaq M. Periodontitis in coronary heart disease patients: strong association between bleeding on probing and systemic biomarkers. *Journal of clinical periodontology*. 2014 Nov;41(11):1048-54.

Bakır B, Yetkin Ay Z, Büyükbayram Hİ, Kumbul Doğuç D, Bayram D, Candan İA, Uskun E. Effect of Curcumin on Systemic T Helper 17 Cell Response; Gingival Expressions of Interleukin-17 and Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor γ t; and Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis. *Journal of periodontology*. 2016 Nov;87(11):e183-91.

Bullon, Pedro, Hubert N. Newman, and Maurizio Battino. "Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction?." *Periodontology 2000* 64.1 (2014): 139-153.

Chambrone L, Foz AM, Guglielmetti MR, Pannuti CM, Artese HP, Feres M, Romito GA. Periodontitis and chronic kidney disease: a systematic review of the association of diseases and the effect of periodontal treatment on estimated glomerular filtration rate. *Journal of clinical periodontology*. 2013 May;40(5):443-56.

Cıfıcbası E, Ciblak M, Kiran B, Badur S, Firatlı E, Issever H, Cıntan S. The role of activated cytotoxic T cells in etiopathogenesis of periodontal disease: does it harm or does it heal?. *Scientific reports*. 2015 Mar 19;5:9262.

da Silva FR, dos Santos Pessoa L, Vasconcelos AC, de Aquino Lima W, Alves EH, Vasconcelos DF. Polymorphisms in interleukins 17A and 17F genes and periodontitis: results from a meta-analysis. *Molecular biology reports*. 2017 Dec 1;44(6):443-53.

dos Santos Carvalho J, Cardoso Guimarães Vasconcelos AC, Herlany Pereira Alves E, dos Santos Carvalho A, da Silva FR, de Carvalho Franca LF, de Padua Rocha Nobrega Neto A, Di Lenardo D, de Souza LK, Barbosa AD, Medeiros JV. Steatosis caused by experimental periodontitis is reversible after removal of ligature in rats. *Journal of periodontal research*. 2017 Oct;52(5):883-92.

Duong BB, Carder ML, Crosby GS, Duric V, Babich V, Di Sole F. Renal Inflammatory Response Mediated by Chronic Pain and Related Stress. *The FASEB Journal*. 2017 Apr;31(1_supplement):697-4.

Duarte PM, Bastos MF, Fermiano D, Rabelo CC, Perez-Chaparro PJ, Figueiredo LC, Faveri M, Feres M. Do subjects with aggressive and chronic periodontitis exhibit a different cytokine/chemokine profile in the gingival crevicular fluid? A systematic review. *Journal of periodontal research*. 2015 Feb;50(1):18-27.

Eke PI, Wei L, Borgnakke WS, Thornton-Evans G, Zhang X, Lu H, McGuire LC, Genco RJ. Periodontitis prevalence in adults \geq 65 years of age, in the USA. *Periodontology 2000*. 2016 Oct;72(1):76-95.

Eke PI, Dye BA, Wei L, Slade GD, Thornton-Evans GO, Borgnakke WS, Taylor GW, Page RC, Beck JD, Genco RJ. Update on prevalence of periodontitis in adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *Journal of periodontology*. 2015 May;86(5):611-22.

Eke PI, Page RC, Wei L, Thornton-Evans G, Genco RJ. Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *Journal of periodontology*. 2012 Dec;83(12):1449-54.

Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *Journal of dental research*. 2012 Oct;91(10):914-20.

Fisher MA, Taylor GW, West BT, McCarthy ET. Bidirectional relationship between chronic kidney and periodontal disease: a study using structural equation modeling. *Kidney international*. 2011 Feb 1;79(3):347-55.

Furusho H, Miyauchi M, Hyogo H, Inubushi T, Ao M, Ouhara K, Hisatune J, Kurihara H, Sugai M, Hayes CN, Nakahara T. Dental infection of *Porphyromonas gingivalis* exacerbates high fat diet-induced steatohepatitis in mice. *Journal of gastroenterology*. 2013 Nov 1;48(11):1259-70.

França L F, Vasconcelos A, da Silva F, et al. Periodontitis changes renal structures by oxidative stress and lipid peroxidation. *J Clin Periodontol* 2017. Jun;44(6):568-76.

Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2015 Jan;15(1):30.

Ioannidou E, Swede H. Disparities in periodontitis prevalence among chronic kidney disease patients. *Journal of dental research*. 2011 Jun;90(6):730-4.

Ilievski V, Kinchen JM, Prabhu R, Rim F, Leoni L, Unterman TG, Watanabe K. Experimental periodontitis results in prediabetes and metabolic alterations in brain,

liver and heart: global untargeted metabolomic analyses. *Journal of oral biology (Northborough, Mass.)*. 2016;3(1).

Ichii O, Otsuka S, Sasaki N, Namiki Y, Hashimoto Y, Kon Y. Altered expression of microRNA miR-146a correlates with the development of chronic renal inflammation. *Kidney international*. 2012 Feb 1;81(3):280-92.

Offenbacher S, Beck JD, Moss K, Mendoza L, Paquette DW, Barrow DA, Couper DJ, Stewart DD, Falkner KL, Graham SP, Grossi S. Results from the Periodontitis and Vascular Events (PAVE) Study: a pilot multicentered, randomized, controlled trial to study effects of periodontal therapy in a secondary prevention model of cardiovascular disease. *Journal of periodontology*. 2009 Feb;80(2):190-201.

Perunovic ND, Rakic MM, Nikolic LI, Jankovic SM, Aleksic ZM, Plecas DV, Madianos PN, Cakic SS. The Association Between Periodontal Inflammation and Labor Triggers (Elevated Cytokine Levels) in Preterm Birth: A Cross-Sectional Study. *Journal of periodontology*. 2016 Mar;87(3):248-56.

Terawaki H, Yoshimura K, Hasegawa T, Matsuyama Y, Negawa T, Yamada K, Matsushima M, Nakayama M, Hosoya T, Era S. Oxidative stress is enhanced in correlation with renal dysfunction: examination with the redox state of albumin. *Kidney international*. 2004 Nov 1;66(5):1988-93.

Vasconcelos DF, Pereira da Silva FR, Pinto ME, Santana LD, Souza IG, Miranda de Souza LK, Oliveira NC, Ventura CA, Novaes PD, Barbosa AL, Medeiros JV. Decrease of Pericytes is Associated With Liver Disease Caused by Ligature-Induced Periodontitis in Rats. *Journal of periodontology*. 2017 Feb;88(2):e49-57.

5. ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM AS NORMAS DO PERIÓDICO

“Journal of Periodontology” (ISSN: 0022-3492)

Alterações renais causadas por periodontite induzida por ligadura foram persistentes após a remoção das ligaduras em ratos.

Renal alterations caused by ligature-induced periodontitis were persistent after removal of the ligatures in rats

Juliana Gomes Galeno¹, Luiz Felipe de Carvalho França¹, Any Carolina Cardoso Guimarães Vasconcelos^{1,2}, Felipe Rodolfo Pereira da Silva¹, Even Herlany Pereira Alves¹, David Di Lenardo¹, Hélio Mateus Silva Nascimento¹, Francisca Beatriz de Melo Sousa³, André Luiz dos Reis Barbosa³, Jand-Venes Rolim Medeiros³, Daniel Fernando Pereira Vasconcelos^{1*}

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

2 Medicine School, Education Institute of Parnaiba Valley (IESVAP), Parnaiba-PI, Brazil;

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

Running Title: Periodontitis causes persistent renal changes.

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

Conflict of Interesting and Source of Funding Statement

The study was supported Federal University of Piaui grants PIBIC 2016/2017, PIBIC 2017/2018); FRPS and EHPA received grants from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

RESUMO

Introdução: O objetivo deste estudo foi elucidar se as alterações renais causadas pela periodontite tiveram reversibilidade após a remoção das ligaduras na periodontite experimental.

Métodos: Vinte e quatro ratas foram divididas em três grupos: controle (sem periodontite), periodontite (20 dias com periodontite induzida) e P20-20 (20 dias com periodontite induzida e 20 dias sem periodontite para verificar a reversibilidade das alterações renais). Os seguintes parâmetros foram avaliados para acompanhar o periodonto: índice de sangramento gengival, profundidade da bolsa de sondagem, atividade de mieloperoxidase, altura do osso alveolar. Para os tecidos renais, utilizou-se a avaliação histopatológica, os níveis de malonaldeído (MDA), o teor de glutathiona (GSH) e os pesos renais. No sangue, foram avaliados creatinina, ácido úrico, albumina, colesterol total, proteínas totais e glicose. Proteína total e creatinina foram investigadas na urina.

Resultados: Os rins do grupo P20-20 não apresentaram reversão de alterações em relação ao grupo com periodontite ao MDA, GSH e avaliações histopatológicas. Por outro lado, apenas os níveis de colesterol total apresentaram reversibilidade no grupo P20-20 comparado ao grupo periodontite.

Conclusão: As alterações renais causadas pela periodontite induzida por ligadura foram persistentes após a remoção das ligaduras em ratos nas condições estudadas.

Palavras-chave: doença periodontal, medicina periodontal, inflamação.

ABSTRACT

Background: The objective of this study was to elucidate if the renal alterations caused by periodontitis had reversibility after the removal of the ligatures in experimental periodontitis.

Methods: Twenty four female rats were divided into three groups: control (without periodontitis), periodontitis (20 days with induced periodontitis) and P20-20 (20 days with induced periodontitis and 20 days without periodontitis to verify the reversibility of renal alterations). The following parameters were evaluated to follow in periodontium: gingival bleeding index, probing pocket depth, myeloperoxidase activity, alveolar bone height. For renal tissues, histopathological evaluation was used, as well as, malonaldehyde (MDA) levels, glutathione (GSH) content and renal weights. In blood, creatinine, uric acid, albumin, total cholesterol, total proteins and glucose were assessed. Total protein and creatinine were investigated in urine.

Results: The kidneys of the P20-20 group did not present the reversion of alterations in relation to the group with periodontitis to the MDA, GSH and histopathological evaluations. On the other hand, only of total cholesterol levels presented reversibility in the P20-20 group compared to the periodontitis group.

Conclusion: Renal alterations caused by ligature-induced periodontitis were persistent after removal of the ligatures in rats in studied conditions.

Key words: periodontal disease, periodontal medicine, inflammation.

RELEVÂNCIA CLINICA

Justificativa científica para o estudo: Estudos associando periodontite e doença renal não incluem o que acontece com o tecido renal após as ligaduras serem removidas.

Achados principais: A avaliação histopatológica renal demonstrou que, nos ratos com periodontite e posterior remoção das ligaduras, os tecidos renais permaneceram com as mesmas alterações, que não apresentaram regressão nas condições estudadas.

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma inflamação destrutiva crônica nos tecidos ao redor dos dentes (Sete et al., 2016) levando a distúrbios orais, bem como, possíveis alterações em vários órgãos (Tomofuji et al., 2007; Tomofuji et al., 2011; França et al., 2017; Vasconcelos et al., 2018). Fatores estão envolvidos no desenvolvimento da periodontite e no curso da inflamação, como espécies bacterianas, a resposta imune do hospedeiro (Oliveira et al., 2016) e a liberação de fatores de quimiotaxia para células inflamatórias (White et al., 2016). Além disso, a composição da saliva, a herança de polimorfismos genéticos específicos (Silva et al., 2017a; Silva et al., 2017b, Silva et al., 2018), alterações nos vasos sanguíneos ou tecido conjuntivo (Alves et al., 2007), quando as bactérias específicas estão presentes, o hospedeiro inicia uma resposta de defesa com uma perspectiva de sinalização não celular, estimulando os neutrófilos e então as prostaglandinas podem contribuir com a inflamação periodontal (Almeida et al., 2006).

Curiosamente, a prevalência de periodontite em pacientes submetidos à hemodiálise é alta (Gonçalves et al., 2007). Na lesão renal aguda, as bactérias gram-negativas e seus lipopolissacarídeos da parede celular presentes na periodontite estão frequentemente envolvidos (Stasi et al., 2016). Para estas bactérias, serão recrutadas grandes quantidades de células de defesa que liberarão o metabolismo das espécies reativas de oxigênio (ROS) e contribuirão para a geração de peróxido lipídico, como o MDA, no rim (Ratliff et al., 2016). Além disso, a dislipidemia pode estar associada a alterações na borda em escova dos túbulos renais (França et al., 2017).

A periodontite pode predispor à doença renal crônica (DRC) da mesma forma que a DRC pode predispor à periodontite, e bactérias associadas à periodontite são consideradas como a fonte da inflamação, o que pode predispor e / ou causar danos renais (Almeida et al., 2011). Um estudo clínico indicou que pacientes com periodontite grave eram propensos à DRC (Ausavarungrun et al., 2016). Outro estudo clínico encontrou maior perda óssea alveolar em pacientes em hemodiálise em comparação com indivíduos controle (Zhao et al., 2014).

A literatura trouxe estudos utilizando modelos animais para periodontite com a avaliação do impacto sistêmico da doença. No entanto, não foi possível identificar a associação exata entre doença renal e periodontite; mesmo com diversos estudos sugerindo uma relação entre as duas condições (Sharma et al., 2014; Zhao et al., 2014; Grauballe et al., 2017; Ausavarungrun et al., 2016).

Demonstramos anteriormente que a periodontite experimental altera as estruturas renais como resultado do estresse oxidativo, bem como da peroxidação lipídica (França et al., 2017). Outro estudo da nossa equipe de pesquisa demonstrou que a remoção da ligadura em ratos com periodontite experimental, foi capaz de reverter a esteatose hepática causada pela periodontite experimental (Carvalho et al., 2017). No entanto, um estudo que avaliou a reversibilidade das alterações renais após a remoção da ligadura em um modelo experimental de periodontite não estava disponível na literatura até o momento. Portanto, o presente estudo tem como objetivo elucidar essa questão, na qual foi realizada uma periodontite induzida por ligadura para analisar se as alterações renais causadas pela periodontite podem ser reversíveis após a retirada das ligaduras.

MATERIAL E MÉTODO

Animais

Vinte e quatro ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* pesando aproximadamente $174,7 \pm 5g$ e com idade média de 10 semanas foram utilizadas. Eles foram mantidos em gaiolas de polipropileno, ambiente de $24 \pm 2^\circ C$, ciclo claro / escuro de 12 horas e livre acesso a alimentos e água. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso dos Animais (CEUA da Universidade Federal do Piauí sob o protocolo n° 385/17).

Design experimental

Os animais foram alocados em três grupos de oito: controle (sem ligaduras), periodontite (ligaduras nos primeiros molares inferiores por 20 dias) e periodontite P20-20 (ligaduras por 20 dias seguidos por mais 20 dias sem ligaduras - período do tempo selecionado para testar a reversibilidade das alterações causadas pela periodontite, de acordo com o estudo permeável de nossa equipe de pesquisa, Carvalho et al., 2017).

Os ratos foram submetidos à indução de periodontite com anestesia intramuscular de solução de cetamina (35mg / kg) (Francotar®, Roseira, SP, Brasil) e xilazina (15mg / kg) (Virbaxil®, São Paulo, SP, Brasil). A periodontite foi induzida pela inserção de ligaduras de náilon (3.0-Shalon® Goiania, GO, Brasil), segundo Pessoa et al., (2018).

Foi realizada, após 20 dias, uma avaliação clínica dos animais dos grupos controle e periodontite, e amostras de sangue foram coletadas (plexo retro-orbital) e amostras de urina para testes bioquímicos. Após a eutanásia dos animais (grupo

controle e periodontite), os rins foram removidos e pesados. Após 20 dias com ligaduras, os animais do grupo P20-20 tiveram as ligaduras removidas e 2% de gel de clorexidina (Biodynamic ®, Ibiporã, PR, Brasil) foi aplicado ao redor dos primeiros molares inferiores (Carvalho et al., 2017), dentes previamente ligado. Aos 40 dias, os mesmos procedimentos descritos anteriormente foram realizados para o grupo P20-20.

Índice de Sangramento Gengival (ISG)

A bolsa periodontal dos primeiros molares inferiores foi sondada por 10 segundos e classificada de acordo com Liu et al., (2012), escores: 0, 1, 2, 3, 4 e 5. Escore 0 significa margem gengival e papila saudável e nenhum sangramento visível após a sondagem. Escore 5 com gengiva gravemente inflamada aparecerá com alteração de cor, edema grave, úlcera, sangramento após uma sonda leve ou hemorragia espontânea.

Avaliação da Mobilidade Dentária (MD)

Os primeiros molares inferiores foram avaliados para MD utilizando sonda periodontal na direção labiolingual (plano lateral) e pontuados de 0 a 3 sendo: 0, mobilidade fisiológica; 1, ligeira mobilidade; 2, mobilidade moderada; e 3, mobilidade pronunciada (Xu e Wei, 2006).

Profundidade da Bolsa para Sondagem (PBS)

O PBS foi medido usando uma sonda arredondada de 0,2 mm de raio. Os pontos mesiovestibular, vestibular e médio-vestibular foram medidos e a média foi utilizada (Liu et al., 2012).

Níveis de mieloperoxidase (MPO), Malondialdeído (MDA) e Glutathiona Reduzida (GSH).

A avaliação da atividade da MPO foi realizada de acordo com Chaves et al.,(2013). A MDA do tecido renal foi medida pelo método de Uchiyama et al., (1978). Os níveis de GSH foram determinados seguindo um método descrito por Sedlak et al., (1968).

Avaliação da Altura do Osso Alveolar (AOA)

As imagens obtidas para avaliação da AOA foram mensuradas usando o ImageJ (Software v.1.48), segundo Vasconcelos et al., (2017). Resumidamente, as mandíbulas foram coradas com solução aquosa de azul de metileno a 1%. Quatro pontos foram medidos na face lingual do longo eixo da raiz dos primeiros molares inferiores. Tudo foi medido a partir da junção cimento-esmalte para a crista óssea.

Avaliação histopatológica renal e histomorfometria

A metade sagital do rim direito foi fixada em 10% tamponada e processada de acordo com França et al., (2017). Secções seriadas de 5 μm de espessura foram coradas com hematoxilina e eosina e também com ácido periódico de Schiff (PAS).

A avaliação histomorfométrica foi realizada de acordo com Imafidon et al., (2016) por um examinador calibrado de maneira cega. Os parâmetros avaliados foram: diâmetro do glomérulo, circunferência do glomérulo e cápsula de Bowman, área do glomérulo e área renal do corpúsculo (μm^2). O volume glomerular foi avaliado de acordo com Gundersen et al. (1988).

Biomarcadores de sangue e urina

Albumina, creatinina, colesterol total de proteínas totais e nitrogênio ureico no sangue e níveis de creatinina na urina foram medidos com kits ELISA comerciais (Labtest®, MG, Brasil). A glicose no sangue dos ratos foi avaliada antes da eutanásia dos ratos utilizando um glicosímetro (Accu-Chek Active, São Paulo, SP, Brasil).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e / ou modo, valor que aparece com maior frequência (mínimo e máximo). O teste estatístico de Shapiro Wilk foi utilizado para verificar a distribuição e normalidade dos dados. A diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste de variância (ANOVA) e pelo teste de Student Newman Keuls para os dados paramétricos, e pelo teste de Kruskal Wallis para dados não paramétricos, seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em 95% ($P < 0,05$) para todas as análises.

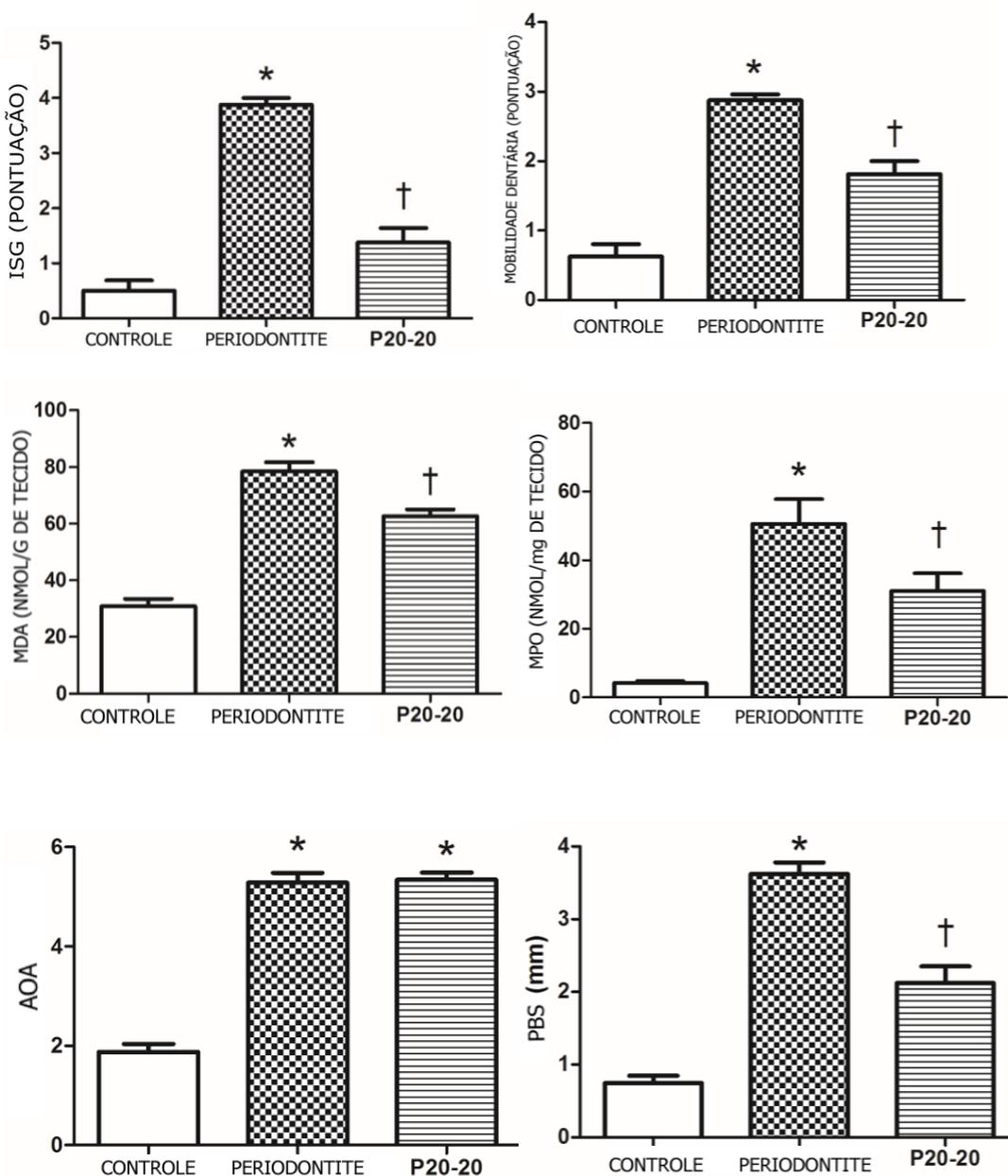
RESULTADOS

ISG, MD, PBS, MDA e MPO.

O grupo periodontite apresentou valores superiores aos grupos controle e P20-20 para os seguintes parâmetros: ISG (grupo controle $0,50 \pm 0,18$; grupo periodontite $3,87 \pm 0,12$; grupo P20-20 $1,37 \pm 0,26$), MD (grupo controle $0,62 \pm 0,17$; grupo periodontite $2,87 \pm 0,08$; grupo P20-20 $1,81 \pm 0,18$), MDA (grupo controle $30,89 \pm 2,59$; grupo periodontite $78,48 \pm 3,23$; grupo P20-20 $62,64 \pm 2,38$), MPO (grupo controle $4,18 \pm 0,62$; grupo periodontite $50,62 \pm 7,19$; grupo P20-20 $31,05 \pm$

5,13) e PBS (grupo controle $0,63 \pm 0,05$; grupo periodontite $3,63 \pm 0,11$; grupo P20-20 $2,13 \pm 0,16$), conforme apresentado na figura 1.

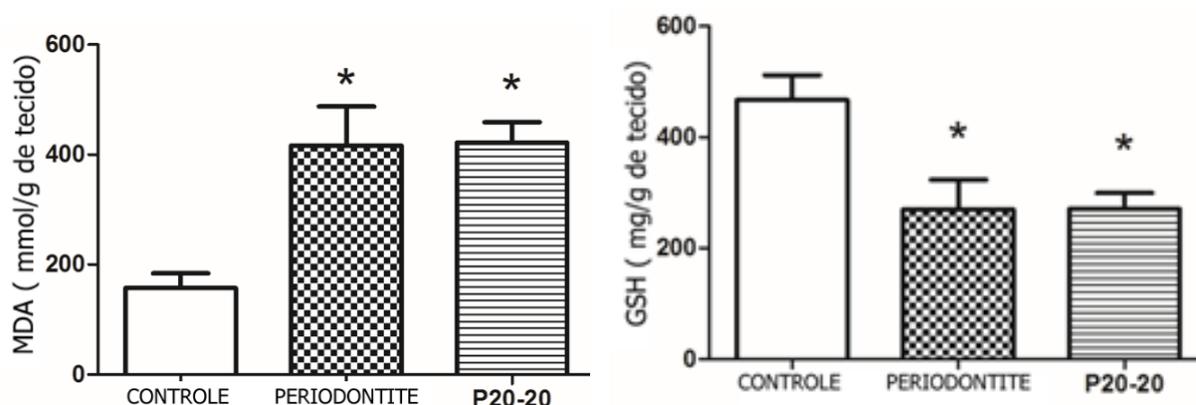
Figura 1. Resultados de Parâmetros Oraís na avaliação da periodontite induzida por ligadura em ratas fêmeas *Wistar*. * P <0,05 versus grupo controle; † P <0,05, versus grupo periodontite.



Em relação à soma AOA, conforme apresentado na figura 1, os valores médios do grupo periodontite e do grupo P20-20 foram, aproximadamente, iguais e significativamente superiores aos do grupo controle (grupo controle $1,87 \pm 0,15$, grupo periodontite $5,28 \pm 0,20$, grupo P20-20 $5,34 \pm 0,14$).

Níveis de MDA e GSH nos tecidos renais

Figura 2. Resultados das dosagens de maldondialdeído (MDA) e glutational (GSH) do Tecido Renal de ratas utilizadas neste estudo para os grupos controle, o grupo periodontite induzida por ligadura e o grupo P20-20 com 20 dias de indução de periodontite e 20 dias de retirada da ligadura.



Em relação aos níveis de MDA nos tecidos renais, o grupo periodontite ($416,9 \pm 70,66$ mmol / g tecido) e o grupo P20-20 ($421,9 \pm 37,08$ mmol / g tecido) apresentaram valores significativamente maiores em relação ao grupo controle ($157,6 \pm 26,78$ mmol / g de tecido), como mostrado na figura 2.

Os níveis de GSH indicam o estresse oxidativo no tecido renal, para o grupo periodontite ($269,6 \pm 53,47 \mu / g$ de tecido) e no grupo P20-20 ($270,7 \pm 28,8 \mu / g$ de tecido) os valores médios foram significativamente menores que o grupo controle ($467,0 \pm 44,81 \mu / g$ de tecido), como mostrado na figura 2. Não houve reversão dos valores de MDA e GSH no grupo P20-20 comparado ao grupo com periodontite.

Parâmetros de peso, biomarcadores sanguíneos (albumina, BUN, creatinina, glicose, colesterol total e proteínas totais) e biomarcadores de urina (proteínas totais e creatinina)

O grupo P20-20 apresentou maior peso médio em relação ao grupo controle e periodontite, devido ao grupo P20-20 ter uma vida mais longa, 20 dias a mais do que os outros dois grupos (Tabela 1).

Não houve diferença nos pesos renais nos diferentes grupos ($P > 0,05$), como visto na tabela 1. Da mesma forma, os níveis séricos de albumina, creatinina e nitrogênio uréico não apresentaram diferença significativa entre os grupos, como visto na tabela 1.

Os níveis de colesterol total foram significativamente maiores no grupo periodontite do que no grupo P20-20 e no grupo controle. O grupo P20-20 apresentou valores aproximadamente semelhantes ao grupo controle. Houve, portanto, reversibilidade dos níveis de colesterol para o grupo P20-20 em comparação com o grupo de periodontite (Tabela 1).

Valores de albumina, creatinina, nitrogênio ureico no sangue, proteínas totais e glicose não apresentaram diferença significativa (Tabela 1). A Tabela 1 também

traz os valores de proteínas totais e creatinina na urina e para ambos os valores não houve diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 1. Parâmetros de peso, biomarcadores sanguíneos (albumina, creatinina, colesterol total, BUN, proteínas totais e glicemia) e biomarcadores de urina (proteínas totais e creatinina)

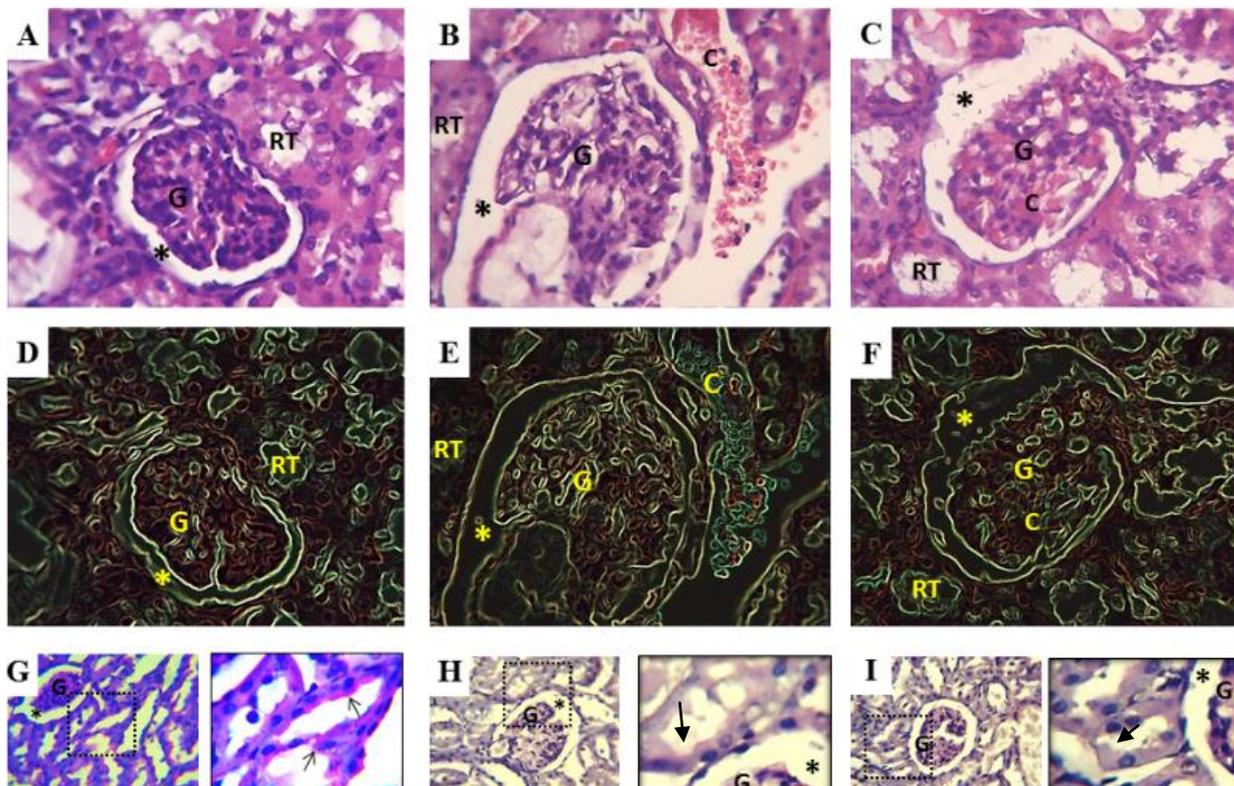
Grupos	Controle	Periodontite	P20-20
Parâmetros de Peso			
Corpo (g)	169,0 ± 0,2	172 ± 0,2	179,9 ± 0,3
Rim			
Absoluto (g)	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,5 ± 0,1
Índice (%)	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Biomarcadores Sanguíneos			
Albumina (g/dL)	1,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,2
Creatinina (U/dL)	0,21 ± 0,0	0,23 ± 0,0	0,24 ± 0,0
Colesterol Total (mg/dL)	74,5 ± 4,6	95,1 ± 5,6*	71,6 ± 8,3†
Nitrogênio Ureico Sanguíneo (U/dL)	36,0 ± 2,1	37,7 ± 2,0	37,6 ± 2,2
Proteínas Totais (g/dL)	9,8 ± 0,5	8,1 ± 0,4	8,5 ± 0,5
Glicemia	298,0 ± 6,2	275,0 ± 5,2	295,0 ± 7,5
Biomarcadores Urinários			
Proteínas Totais (g/dL)	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Creatinina (U/dL)	13,1 ± 0,2	14,7 ± 0,2	14,1 ± 0,2

ANOVA seguido pelo teste de Tukey. * P <0,05 versus grupo controle; † P <0,05, versus grupo periodontite.

Avaliação histopatológica renal e histomorfometria

Os rins do grupo controle (Figura 3A) não apresentaram alterações histológicas renais. Por outro lado, os rins dos animais do grupo periodontite apresentaram alterações morfológicas renais significativas, como aumento ($P < 0,05$) no tamanho do corpúsculo renal, espaço da cápsula de Bowman, diâmetro e circunferência da cápsula de Bowman (Tabela 2) e congestão peritubular (Figura 3B). A Figura 3C mostrou que os rins do grupo P20-20 apresentaram alterações semelhantes, em comparação com o grupo periodontite. Em relação à coloração com PAS, os rins dos ratos do grupo controle revelaram intensa reação positiva de PAS (seta) na borda em escova dos túbulos renais (Figura 3G), zoom no retângulo. O grupo renal de periodontite apresentou reação de PAS fraca (Figura 3H) na borda em escova dos túbulos renais (PAS), demonstrando alteração da borda em escova nos túbulos renais nos grupos que receberam as ligaduras (periodontite e grupos P20-20) em relação ao grupo controle, zoom em retângulos. Esses achados revelaram que as alterações renais causadas pela periodontite não foram revertidas após a retirada das ligaduras.

Figura 3. Imagens do Córtex Renal com Coloração de Hematoxilina - HE e Eosina e Ácido Perióxido de Schiff – PAS.



A) Grupo Controle .Mostra rim com glomérulo (G), túbulos renais (RT), espaço da capsular de Bowman (*). Coloração HE

B) Grupo Periodontite. Mostra aumento no tamanho do corpúsculo renal, espaço da capsular de Bowman (*), circunferência e diâmetro da cápsula de Bowman, glomérulo (G) e congestão (C). Coloração HE

C) Grupo P20-20. Mostra que após a remoção da ligadura as alterações renais histológicas ainda estavam presentes como aumento da circunferência e diâmetro da cápsula de Bowman e do glomérulo (G). Coloração HE. Todas as imagens estão em ampliação original de 600 x

- D) Grupo Controle.**Mostra rim com glomérulo (G), túbulos renais (RT), espaço da capsular de Bowman (*).Imagens são coradas com HE com filtro para extremidades.
- E) Grupo Periodontite.** Mostra aumento no tamanho do corpúsculo renal, espaço da capsular de Bowman (*), circunferência e diâmetro da cápsula de Bowman , glomérulo (G) e congestão (C). Imagens são coradas com HE com filtro para extremidades.
- F) Grupo P20-20.** Mostra que após a remoção da ligadura as alterações renais histológicas ainda estavam presentes como aumento da circunferência e diâmetro da cápsula de Bowman e do glomérulo (G). Imagens são coradas com HE com filtro para extremidades.
- G) Grupo Controle.** Rim com forte reação positiva de PAS (seta) na borda em escova dos túbulos renais. Imagens são coradas com PAS
- H) Grupo Periodontite.** Fraca reação PAS (seta) na borda em escova dos túbulos renais, demonstrando ruptura da borda em escova no túbulo renal no grupo periodontite, quando comparado com grupo controle, zoom em retângulo. Imagens são coradas com PAS.
- I) Grupo P 20-20.** Segue semelhante ao grupo periodontite com fraca reação PAS (seta) na borda em escova dos túbulos renais, demonstrando que a ruptura da borda em escova nos túbulos renais mantiveram se após a remoção do quadro de periodontite induzida. . Imagens são coradas com PAS.

Tabela 2. Avaliação Histomorfométrica dos Rins

Grupos	Controle	Periodontite	P20-20
Histomorfometria renal			
Circunferência da cápsula de Bowman	379,0 ± 9,2	527,3 ± 14,5*	517,3 ± 11,8*
Espaço da cápsula de Bowman	37,9 ± 1,2	51,7 ± 2,1*	50,8 ± 1,9*
Área do cospusculo renal	985,5 ± 35,7	1.1989 ± 52,7*	1.205,8 ± 45,7*
Volume Glomerular	0,9 ± 0,0	1,2 ± 0,0*	1,2 ± 0,0*
Diâmetro do glomérulo	95,2 ± 3,8	121,8 ± 2,8*	129,3 ± 3,7*
Circunferência do glomérulo	359,5 ± 15,2	442,9 ± 5,9*	445,1 ± 9,4*

ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. * P <0,05 versus grupo controle.

† P <0,05, versus grupo periodontite. Os dados demonstraram que as alterações histomorfométricas renais causadas pela periodontite não podem ser revertidas após a remoção da ligadura.

DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo focado na avaliação da possível reversibilidade das alterações renais causadas pela periodontite experimental, como foi demonstrado previamente por nossa equipe de pesquisa (França *et al.*, 2017). Nossos dados não mostraram alterações renais significativas entre o grupo periodontite e o grupo P20-20 para os parâmetros histopatológicos, histomorfométricos e bioquímicos avaliados.

Esses resultados revelaram que as alterações renais causadas pela periodontite não são revertidas após a remoção das ligaduras nas condições estudadas.

Os resultados demonstraram sucesso no modelo de periodontite. Esse sucesso foi verificado pelos parâmetros bucais avaliados, o que permitiu verificar os parâmetros renais de forma confiável.

As concentrações dos teores de MDA e GSH nos tecidos renais (parâmetros que indicam estresse oxidativo) mostraram que, os valores do grupo P20-20 não reverteram para valores próximos aos do grupo controle, permanecendo alterados conforme os valores encontrados no grupo periodontite. Nesse estudo, os níveis de colesterol total foram revertidos em comparação ao grupo controle, após a remoção das ligaduras, à semelhança de outro estudo da equipe de pesquisa (Carvalho et al., 2017). Essa ligação também é notada em um estudo que demonstrou que os pacientes que receberam tratamento periodontal tiveram uma diminuição nos níveis de colesterol após 2 meses de tratamento (D'aiuto et al., 2005).

Os dados referentes à albumina, ao nitrogênio uréico sanguíneo, à creatinina, à glicose e às proteínas totais não apresentaram diferença significativa entre os grupos, à semelhança dos outros estudos (Carvalho et al., 2017; França et al., 2017; Vasconcelos et al., 2017 Pessoa et al., 2018; Vasconcelos et al., 2018). Da mesma forma, os biomarcadores urinários também não apresentaram diferença significativa entre os grupos quanto aos níveis de creatinina e proteínas totais. Esse achado está de acordo com estudos como o de Barcellos (2017) que não observou relação entre creatinina e presença de periodontite como em estudo com cães e França et al., (2017) com ratos.

Com relação à histomorfometria, os rins dos animais dos grupos periodontite e P20-20 apresentaram alterações morfológicas renais significativas, como aumento do tamanho do corpúsculo renal, espaço da cápsula de Bowman, diâmetro e circunferência da cápsula de Bowman (Tabela 2) e congestão peritubular (Figura 3B), demonstrando que as alterações renais causadas pela periodontite não são revertidas sob essas condições.

Um estudo de revisão recente está de acordo com nossos achados, uma vez que concluiu que a terapia periodontal contribuiu de forma benéfica para a prevenção de infecções respiratórias, e não encontrou relação entre a periodontite e seu efeito benéfico para a DRC (Sabharwal *et al.*, 2018). Além disso, um estudo de coorte observou que o tratamento periodontal influenciou positivamente o curso da DRC dos pacientes (Almeida *et al.*, 2017). Outro estudo também afirmou que o tratamento periodontal poderia melhorar o estado inflamatório de pacientes com doença renal terminal, com melhorias em vários parâmetros, variando de interleucinas-6, a albumina e creatinina (Fang *et al.*, 2015).

Foi demonstrado que a periodontite poderia agravar as alterações renais (Chen *et al.*, 2017). Essa relação foi evidenciada pelos resultados de metanálises anteriores que avaliaram a associação entre doença periodontal e DRC (SDeschamps-Lenhardt *et al.*, 2018). Também foi corroborado por um estudo que associou condições periodontais em pacientes com DRC onde encontraram 99,9% de pacientes com periodontite em diferentes graus de gravidade e aqueles diagnosticados com DRC mais longa tiveram o dobro de dentes com diagnóstico de periodontite (Cholewa *et al.*, 2018). Uma revisão sistemática encontrou evidências da associação não-direcional de periodontite com DRC (Zhao *et al.*, 2018). Outra

meta-análise confirma a associação relatada anteriormente, mas não encontrou evidência para a direção oposta (DRC levando à DP) (Kapellas *et al.*, 2018). Um estudo transversal em humanos com DRC concluiu que a gravidade da DRC estava diretamente relacionada à gravidade da periodontite (Ausavarungnirun *et al.*, 2016). Outro estudo, em um estudo de coorte retrospectivo, constatou que a periodontite é prevalente em indivíduos com alto risco de DRC e está associada à diminuição da função renal (Grubbs *et al.*, 2015). Em um estudo de caso-controle, concluiu-se que a DP poderia servir como um fator de risco para o desenvolvimento da DRC (Pradeep *et al.*, 2012). Em um estudo com indivíduos com periodontite, com ou sem hemodiálise, observou-se que a periodontite foi mais severa e com maior perda óssea em pacientes submetidos à HD (Zhao *et al.*, 2014).

A reversibilidade das alterações causadas pela periodontite pode ser observada no fígado de ratos no mesmo período deste estudo (Carvalho *et al.*, 2017), essa diferença pode estar associada à diferença de que o tecido hepático tem capacidade de regenerar mais que os rins.

O grupo periodontite em nosso estudo confirmou os dados dos estudos apresentados acima, demonstrando que as alterações renais podem ser causadas pela periodontite. Os rins dos animais do grupo P20-20 podem não ter tido tempo suficiente, após a remoção das ligaduras, para mostrar uma melhora no padrão histomorfométrico, já que vemos que os estudos mostram uma relação do tratamento periodontal com a DRC, literatura ainda precisa de mais pesquisas com design diferente de estudos poderia esclarecer essa relação.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que as alterações renais causadas pela periodontite induzida por ligadura foram persistentes após a remoção das ligaduras em ratos nas condições estudadas.

Contribuição dos autores

LFCF, FRPS, EHPA, JSC, DL, ACCGV e LKMS contribuíram para o design, aquisição de dados, análise e interpretação, redigiram e revisaram criticamente o manuscrito; ALRB, JVRM e JSO contribuíram para o desenho e interpretação dos dados, redigiram e revisaram criticamente o manuscrito; O DFPV contribuiu para a concepção, projeto, aquisição de dados, análise e interpretação, redigiu e revisou criticamente o manuscrito. Todos os autores deram aprovação final e concordaram em prestar contas de todos os aspectos do trabalho.

Agradecimentos

O estudo foi apoiado pela Universidade Federal do Piauí concede PIBIC 2016/2017, PIBIC 2017/2018); A FRPS e a EHPA receberam bolsas da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

REFERENCIAS

1. Sete M, Figueredo C, Sztajnbock F. Periodontitis and systemic lupus erythematosus. *Rev Bras Reumatol* 2016;56(2), 165-170.
2. Tomofuji T, Ekuni D, Yamanaka R, Kusano, H, et al. Chronic administration of lipopolysaccharide and proteases induces periodontal inflammation and hepatic steatosis in rats. *J Periodontol* 2007; 78(10), 1999-2006.
3. Tomofuji T, Ekuni D, Irie K. Relationships between periodontal inflammation, lipid peroxide and oxidative damage of multiple organs in rats. *Biomed Res.* 2011;32(5):343-9.
4. França L F, Vasconcelos A, da Silva F, et al. Periodontitis changes renal structures by oxidative stress and lipid peroxidation. *J Clin Periodontol* 2017. Jun;44(6):568-76.
5. Vasconcelos ACCG, Vasconcelos DFP, Silva FRP, et al. Periodontitis causes abnormalities in the liver of rats. *J Periodontol.* 2018. doi:10.1002/JPER.18-0226. [Epub ahead of print]
6. Oliveira R, Fermiano D, Feres M, et al. Levels of candidate periodontal pathogens in subgingival biofilm. *J Dent Res* 2016; 95(6), 711-718.
7. White P, Chicca I, Cooper P, Milward M, Chapple I. Neutrophil extracellular traps in periodontitis: a web of intrigue. *J Dent Res* 2016 ; 95(1), 26-34.
8. Silva F, 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. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2017a;22 e7-e14.
9. Silva F, et al. Polymorphisms in interleukins 17A and 17F genes and periodontitis: results from a meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.* (2017b); 44.443-453.
10. Silva FRP, Vasconcelos ACCG, França LFC, Lenardo D, Nascimento HMS, Vasconcelos DFP. Association between the rs1143634 polymorphism in interleukin-1B and chronic periodontitis: results from a meta-analysis composed by 54 case/control studies. *Gene.* 2018;668:97-106. doi:10.1016/j.gene.2018.05.067.
11. Alves C, Andion J, Brandão M, Menezes R . [Pathogenic aspects of the periodontal disease associated to diabetes mellitus Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007;51(7):1050-7. doi:10.1590/S0004-27302007000700005. [Article in portuguese]
12. Almeida R, Pinho M, Lima C, Faria I, Santos P, Bordalo C. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. *Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar* 2006; 22(3), 37.
13. Gonçalves É, Karam L, Milfont T, et al. Prevalência de periodontite em pacientes submetidos à hemodiálise. *J Bras Nefrol* 2007; 29(3), 115-9.
14. Stasi A, Intini A, Divella C, et al. Emerging role of Lipopolysaccharide binding protein in sepsis-induced acute kidney injury. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* 2016; 32(1), 24-31.

15. Ratliff B, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin M. Oxidant mechanisms in renal injury and disease. *Antioxid Redox Signal* 2016; 25(3), 119-146.
16. Carvalho França L, Vasconcelos A, Silva F, et al. Periodontitis changes renal structures by oxidative stress and lipid peroxidation *J Clin Periodontol* 2017. Jun;44(6):568-76.
17. Almeida, D. C. D., Pereira, C. S., Granjeiro, J. M., Machado, W. A. S., Tostes, F. R. V., & Barboza, E. D. S. P. (2011). A relação bidirecional entre doença periodontal e doença renal crônica: Da progressão da doença renal crônica a terapia renal substitutiva de diálise. *R Periodontia*, 21(1), 73-9. 9-90.
18. Ausavarungnirun R, Wisetsin S, Rongkiettechakorn N, et al. Association of dental and periodontal disease with chronic kidney disease in patients of a single, tertiary care centre in Thailand. *BMJ open* 2016; 6(7), e011836.
19. Zhao D, Zhang S, Chen X, Liu W, Sun N, Guo Y. Evaluation of periodontitis and bone loss in patients undergoing hemodialysis. *Journal of periodontology* 2014; Nov;85(11):1515-20.
20. Sharma P, Dietrich T, Ferro C, Cockwell P, Chapple IL. Association between periodontitis and mortality in stages 3–5 chronic kidney disease: NHANES III and linked mortality study. *J Clin Periodontol* 2016; Feb;43(2):104-13.
21. Grauballe M, Østergaard J, Schou S, Flyvbjerg A, Holmstrup P. Blockade of RAGE in Zucker obese rats with experimental periodontitis. *J Periodontal Res* 2017; Feb;52(1):97-106.
22. Vasconcelos D, Pereira da Silva F, Pinto M, et al. Decrease of Pericytes is Associated With Liver Disease Caused by Ligature-Induced Periodontitis in Rats. *J Periodontol*. 2017; Feb;88(2):e49-57.
23. Liu R, Li N, Liu N, et al. Effects of systemic ornidazole, systemic and local compound ornidazole and pefloxacin mesylate on experimental periodontitis in rats. *Med Sci Monit* 2012;18(3):BR95.
24. Chaves L, Nicolau L, Silva RO, et al. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2013; Feb 1.35(1):93-100.
25. Imafidon E, Akomolafe R, Oladele A. Sexually dimorphic proteinuria in Wistar rats: relevance to clinical models. *Pathophysiology* 2016 Mar 1;23(1):51-9.
26. Gundersen H, Bagger P, Bendtsen T, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988 Jul 1;96(7-12):857-81.
27. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry* 1978 May 1;86(1):271-8.

28. Sedlak J, Lindsay R. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*. 1968 Jan 1;25:192-205.
29. Wu T, Trevisan M, Genco R, Falkner K, Dorn J, Sempos C. Examination of the relation between periodontal health status and cardiovascular risk factors: serum total and high density lipoprotein cholesterol, C-reactive protein, and plasma fibrinogen. *Am J Epidemiol* 2000 Feb 1;151(3):273-82.
30. Machado A, Quirino M, Nascimento L. Relation between chronic periodontal disease and plasmatic levels of triglycerides, total cholesterol and fractions. *Braz Oral Res*. 2005 Dec;19(4):284-9.
31. D'aiuto F, Nibali L, Parkar M, Suvan J, Tonetti M. Short-term effects of intensive periodontal therapy on serum inflammatory markers and cholesterol. *J Dent Res*. 2005 Mar;84(3):269-73.
32. Katz J, Flugelman M, Goldberg A, Heft M. Association between periodontal pockets and elevated cholesterol and low density lipoprotein cholesterol levels. *J Periodontol* 2002 May 1;73(5):494-500.
33. Penumarthy S, Penmetsa GS, Mannem S. Assessment of serum levels of triglycerides, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol in periodontitis patients. *J Indian Soc Periodontol*. 2013 Jan;17(1):30.
34. Kiany Yazdi F, Karimi N, Rasouli M, Roozbeh J. Effect of nonsurgical periodontal treatment on C-reactive protein levels in maintenance hemodialysis patients.. 2013 Jun 1;35(5):711-7.
35. Koo HS, Hong SM. Prevalence and Risk Factors for Periodontitis Among Patients with Metabolic Syndrome. *Metab Syndr Relat Disord*. 2018 Sep;16(7):375-381. doi: 10.1089/met.2018.0003. Epub 2018 Jun 12.
36. Hayashi J, Hasegawa A, Hayashi K, et al. Effects of periodontal treatment on the medical status of patients with type 2 diabetes mellitus: a pilot study. *BMC Oral Health* 2017 Dec;17(1):77.
37. Cholewa M, Madziarska K, Radwan-Oczko M. The association between periodontal conditions, inflammation, nutritional status and calcium-phosphate metabolism disorders in hemodialysis patients. *J Appl Oral Sci* 2018;26.
38. Barcellos RR. Assessment of serum creatinine and urinary protein / creatinine ratio in dogs with periodontal disease. [Dissertation]. Porto Alegre, RS: Federal University of Rio Grande do Sul; 2017. 38p.
39. Sabharwal A, Gomes-Filho IS, Stellrecht E, Scannapieco FA. Role of periodontal therapy in management of common complex systemic diseases and conditions: An update. *Periodontol* 2000. 2018 Oct;78(1):212-26.
40. Almeida S, Figueredo CM, Lemos C, Bregman R, Fischer RG. Periodontal treatment in patients with chronic kidney disease: a pilot study. *J Periodontal Res*. 2017 Apr;52(2):262-7. doi:10.1111/jre.12390.

41. Fang F, Wu B, Qu Q, et al. The clinical response and systemic effects of non-surgical periodontal therapy in end-stage renal disease patients: a 6-month randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2015 Jun;42(6):537-46.
42. Chen P, Xuan DY, Zhang JC. Periodontitis aggravates kidney damage in obese mice by MMP2 regulation. *Bratisl Lek Listy* 2017;118(12):740-5.
43. Deschamps-Lenhardt S, Martin-Cabezas R, Hannedouche T, Huck O. Association between periodontitis and chronic kidney disease: Systematic review and meta-analysis. *Oral Dis*. 2018. doi:10.1111/odi.12834. [Epub ahead of print]
44. Zhao D, Khawaja AT, Jin L, Li KY, Tonetti M, Pelekos G. The directional and non-directional associations of periodontitis with chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Periodontal Res* 2018; May 18.
45. Kapellas K, Singh A, Bertotti M, Nascimento G, Jamieson LM, Perio-CKD collaboration. Periodontal and chronic kidney disease association: a systematic review and meta-analysis. *Nephrology (Carlton)*. 2018 Jan 23. doi:10.1111/nep.13225. [Epub ahead of print]
46. Grubbs V, Vittinghoff E, Beck JD, Kshirsagar AV, Wang W, Griswold ME, Powe NR, Correa A, Young B. Association between periodontal disease and kidney function decline in African Americans: The Jackson Heart Study. *J Periodontol*. 2015 Oct;86(10):1126-32.
47. Pradeep A, Kathariya R, Raju P, Rani R, Sharma A, Raghavendra N. Risk factors for chronic kidney diseases may include periodontal diseases, as estimated by the correlations of plasma pentraxin-3 levels: a case-control study. *Int Urol Nephrol*. 2012 Jun 1;44(3):829-39.
48. Xu Y, Wei W. A comparative study of systemic sub antimicrobial and topical treatment of minocycline in experimental periodontitis of rats. *Arch Oral Biol*. 2006;51:794-803.

APÊNDICE 1

PRESS RELEASE

GENGIVA INFLAMADA, E DAÍ?

Galeno JG; Vasconcelos DFP

Juliana Gomes Galeno – Aluna do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPI (PPGO-UFPI);

Daniel Fernando Pereira Vasconcelos – Professor do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPI (PPGO-UFPI)

Em meio a enfermidades que assolam a sociedade contemporânea frente a uma série de fatores, a exemplo do estresse (insônia, depressão, transtornos alimentares, etc.); da maior liberdade sexual, com incidência ascendente das IST ou Infecções Sexualmente Transmissíveis, com ênfase para a AIDS; da tecnologia desenfreada, causando o que se chama tecnofobia ou tecnoestresse, as enfermidades causadas por problemas odontológicos parecem relegadas pela grande mídia, ainda que, paradoxalmente, há décadas e anos, em diferentes países, com destaque para os Estados Unidos e Japão, pesquisadores venham estudando, com afinco, as causas da enfermidade que acomete os tecidos ao redor dos dentes.

O osso, os elementos dentais e a gengiva que os protegem formam a região nomeada de periodonto. Para melhor compreensão do público, trata-se do tecido que fixa o dente no alvéolo, local onde pode se desenvolver essa doença inflamatória. Trata-se da periodontite = periodonto + -ite. Em linguagem médica, o -ite consta como sufixo de composição, que indica doença ou inflamação do órgão ou da estrutura anatômica indicada no radical. Portanto, em termos conceituais, reitera-

se que a periodontite é uma inflamação do periodonto, que acomete indivíduos de qualquer nacionalidade, de faixas etárias distintas e de condições socioeconômicas variadas, ou seja, caracteriza-se como mal que não escolhe raça, cor, orientação sexual ou credo.

Com certa frequência, a periodontite leva à perda do osso que sustenta os dentes, de tal forma que quanto mais a inflamação evolui, maiores são as chances de o dente afetado ser perdido, exatamente, por falta de sustentação. Ademais, o processo da doença pode causar dores, halitose (mau hálito), desconforto e sangramento gengival. Decerto, a higiene inadequada da boca figura como elemento que incita ou favorece o início da periodontite. No entanto, a bem da verdade, há muitos outros elementos que influenciam tanto seu aparecimento quanto seu desenvolvimento e agravamento. Dentre eles, citam-se a presença invasiva de certas bactérias, além de traços inerentes à singularidade de cada indivíduo, a exemplo de sua imunidade, composição da saliva que produz e eventuais alterações em seus vasos sanguíneos.

Em se tratando do Brasil, há avanço sistemático no que se refere ao combate à enfermidade. No caso específico do Piauí, dissertação de mestrado conduzida no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Piauí (PPGO / UFPI), sob a responsabilidade direta de Juliana Gomes Galeno e do Grupo de Pesquisa liderado pelo orientador Daniel Fernando Pereira Vasconcelos, cirurgião-dentista e Professor Doutor em Biologia Patologia Buco Dental pela Universidade Estadual de Campinas e Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPI, aponta, dentre os resultados centrais, que a periodontite pode agravar alterações nos rins de forma persistente.

De fato, os rins não são os únicos órgãos afetados pela enfermidade. Equipe de pesquisa conduzida pelo pesquisador japonês, Takaaki Tomofuji, também já inferiu que a periodontite altera, seriamente, órgãos, como cérebro, fígado e coração. Demais estudos comprovam, ainda, que essa modalidade de inflamação pode tornar mais séria outras doenças, a exemplo do diabetes, gerando quadro clínico negativo ao portador da doença, o que demanda, invariavelmente, acompanhamento sistemático por um cirurgião dentista. Em suma, é preciso que a população atente para a relevância da higiene bucal e de quaisquer alterações que afetem suas gengivas, a fim de que, de imediato, busque diagnóstico e tratamento adequado. Afinal, gengiva inflamada tem jeito, sim, senhor!

APÊNDICE 2

Produção Intelectual durante o Mestrado

Apresentação de Trabalhos

1. Polimorfismos nos Genes das Interleucinas 17A e 17F e periodontite: resultados de uma metanálise – Juliana Gomes Galeno (Autor). 34º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO 2017.
2. Associação entre a infecção da *Helicobactéria pylori* e a periodontite: Revisão Sistemática e Metanálise – Juliana Gomes Galeno(coautor). 6º Simpósio Internacinal de Imunologia – 2018
3. Efeitos da bromelaína (derivada do *Ananas comosus*) na pele após incisão cirúrgica experimental em pata de ratas – Juliana Gomes Galeno(coautor) – 2017

Outros trabalhos

2017 – Avaliador de vagas para Curso de Especialização em Gestão em Saúde - UESPI.

ANEXO 1 –
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

	<p>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p> <p><small>Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550 Telefone: (86) 3215-5734 _e-mail: cecapi@ufpi.edu.br</small></p>	
CERTIFICADO		
<p>Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos de diferentes tratamentos para esteatose causada pela periodontite induzida em animais", registrada nº 385/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. DANIEL FERNANDO PEREIRA VASCONCELOS do Departamento de Biomedicina_Campus Ministro Reis Veloso/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 08/09/2017.</p>		
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica	
Vigência da Autorização	Janeiro/2018 à Janeiro/ 2022	
Espécie/Linhagem/raça	<i>Rato isogênico/ wistar</i>	
Nº de Animais	70	
Peso/ Idade	200g/ 12 sem.	
Sexo	Machos	
Origem	Biotério Central da UFPI.	
<p>Teresina, 08 de Setembro de 2017.</p> <p style="text-align: center;"> Prof. Ivete L. de Mendonça Comitê de Ética em Experimentação Animal/UFPI Coordenadora</p>		

ANEXO 2

Normas de submissao do artigo na revista “Journal of Periodontology”

Author Guidelines

Journal of Periodontology Author Instructions

Manuscript Categories

The *Journal of Periodontology* publishes articles relevant to the science and practice of periodontics and related areas. Manuscripts are accepted for consideration with the understanding that text, figures, photographs, and tables have not appeared in any other publication, except as an abstract prepared and published in conjunction with a presentation by the author(s) at a scientific meeting, and that material has been submitted only to this journal.

The *Journal of Periodontology* accepts manuscript submissions online at [ScholarOne Manuscripts](#). To start a new submission, enter the Author Center and click "Start New Submission" in the left menu box. Details regarding each submission step are located at the top of the page in ScholarOne Manuscripts. Authors should prepare manuscripts in accordance with the instructions below. Failure to do so may result in delays or manuscript unsubmission.

MANUSCRIPT CATEGORIES AND SPECIFIC FORMATS

Submissions to the *Journal of Periodontology* should be limited to one of the categories defined below. Specific information regarding length and format is provided for each category. Please also refer to the instructions provided under [General Format](#) and [Style](#). All manuscripts will be reviewed by the Editors for novelty, potential to extend knowledge, and relevance to clinicians and researchers in the field. Some manuscripts will be returned without review, based on the Editors' judgment of the appropriateness of the manuscript for the *Journal of Periodontology*.

ORIGINAL ARTICLES

These are papers that report significant clinical or basic research on the pathogenesis, diagnosis, and treatment of the different forms of periodontal disease. Papers dealing with design, testing, and other features of dental implants are also included.

Format

Original articles must be limited to 4,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50 references, and the total combined number of figures and tables must be six or fewer. Multi-panel figures are acceptable.

Abstract

All original articles should be submitted with a structured abstract, consisting of no more than 250 words and the following four paragraphs:

- Background: Describes the problem being addressed.
- Methods: Describes how the study was performed.
- Results: Describes the primary results.
- Conclusion(s): Reports what authors have concluded from these results, and notes their clinical implications.

Introduction

The Introduction contains a concise review of the subject area and the rationale for the study. More detailed comparisons to previous work and conclusions of the study should appear in the Discussion section.

Materials and Methods

This section lists the methods used in the study in sufficient detail so that other investigators would be able to reproduce the research. When established methods are used, the author need only refer to previously published reports; however, the authors should provide brief descriptions of methods that are not well known or that have been modified. Identify all drugs and chemicals used, including both generic and, if necessary, proprietary names and doses. The populations for research involving humans should be clearly defined and enrollment dates provided.

Results

Results should be presented in a logical sequence with reference to tables, figures, and supplemental material as appropriate.

Discussion

New and possible important findings of the study should be emphasized, as well as any conclusions that can be drawn. The Discussion should compare the present data to previous findings. Limitations of the experimental methods should be indicated, as should implications for future research. New hypotheses and clinical recommendations are appropriate and should be clearly identified. Recommendations, particularly clinical ones, may be included when appropriate.

REVIEW ARTICLES

The *Journal of Periodontology* is no longer accepting submissions of reviews. Authors may be invited to submit reviews for potential publication, but unsolicited reviews will no longer be accepted.

COMMENTARIES

The purpose of these papers is to provide a forum for discussion of controversies and other issues as they relate to the practice of periodontics and implant dentistry. Full and balanced discussion of controversies on important issues is encouraged. This may result in several authors each presenting a relevant viewpoint. Commentaries should be concise (2,000 to 3,000 words) with no more than 50 references; however, they should be complete and balanced, which may require that the issue or controversy addressed be highly focused.

Introduction

This section should clearly state the clinical question or issues to be discussed and document their importance and timeliness.

Body

The body should present the information supporting all aspects of the issues. This portion of the Commentary may be subdivided as appropriate with headings. Figures, tables, and other illustrative materials may be incorporated. The total combined number of figures and tables should not exceed six.

Summary

The summary should place the issue in perspective and point a way for future directions in addressing the controversy.

Acknowledgment(s)

Since these papers allow authors to express their opinions on a subject, it is extremely important that authors disclose any and all affiliations, financial position, or any other information that constitutes a real or perceived conflict of interest.

CASE SERIES

The *Journal of Periodontology* no longer publishes Case Reports. Authors are encouraged to submit Case Reports to *Clinical Advances in Periodontics*. The *Journal of Periodontology* publishes selected Case Series that describe unusual case presentations, complex diagnoses, and novel approaches to treatment within the scope of practice of periodontology. These Case Series provide valuable information for clinicians and teachers in the field.

Case Series report a sufficient number of consecutive or randomized cases to make a persuasive argument for or against the procedure, technique, or concept under discussion. Cases should be relatively homogeneous so that a systematic evaluation of one type of disease, lesion, or condition is made for the procedure under consideration. Also, treatment and documentation should be consistent and standardized for all cases. It is recognized that definitive evidence for the safety and efficacy of any procedure, drug, or device comes primarily from well-designed, randomized, controlled trials. However, well-executed Case Series may lead to hypotheses about the usefulness of new and innovative procedures, drugs, or devices and may therefore be of value to the progress of clinical science.

The requirements for patient consent, privacy, and institutional approval are well defined for manuscripts describing research on human subjects. These basic requirements are described by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) in their Uniform Requirements for

Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (available at: www.icmje.org) and are interpreted in the instructions to authors of all peer-reviewed biomedical journals, including the *Journal of Periodontology*.

Due to the changing ethical and legal environment around the use of patient information, the editorial team has received multiple questions about the need for subject consent from patients described in Case Series submitted for publication.

The following applies to most Case Series. It should be noted that the Editors will determine whether specific Case Series require additional approvals beyond what is described below.

Requirement for Ethics Board Approval

Most Case Series are a retrospective description of clinical findings in cases or an observed course of events that document a new aspect of patient management during the normal course of clinical treatment. Since there is no hypothesis testing, no systematic data collection beyond that which is part of routine clinical practice, no data analysis, and the work has already been done, Case Series do not usually qualify as "research" requiring approval from ethical boards designed to protect humans involved in clinical research.

(U.S. Fed. definition: "RESEARCH is any systematic investigation, including research development, testing and evaluation, designed to develop or contribute to generalizable knowledge.")

Example 1: Series of private practice implant cases in patients who have been taking bisphosphonates. Authors describe the findings in each case, which are collected and reported in a table format.

Example 2: Authors collect series of private practice implant cases in patients who have or have not been taking bisphosphonates. The sample size is sufficient for data analysis, and authors analyze and report the incidence of complications.

Example 1 does not qualify as "research," but example 2 does qualify and requires ethical approval.

Please see "[Does My Case Series Need IRB Approval?](#)" for more information.

Privacy in Case Series

No patient identifiers should be included in Case Series. If the authors choose to include any subject identifiers, the authors must include the patient's informed written consent to publish the information.

Our policy conforms to the Uniform Requirements, which states: "Patients have a right to privacy that should not be violated without informed consent. Identifying information, including names, initials, or hospital numbers, should not be published in written descriptions, photographs, or pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that an identifiable patient be shown the manuscript to be published. Authors should disclose to these patients whether any potential identifiable material might be available via the Internet as well as in print after publication."

It should be noted that patients may have given a signed "consent to treat," but that does not constitute permission to publish their case with personal identifiers unless they have explicitly approved the manuscript. Likewise, patient consent under government privacy rules, such as the Health Insurance Portability and Accountability Act (HIPAA) in the United States, does not constitute permission to publish their case with personal identifiers unless they have explicitly approved the manuscript.

Format

Case Series must be limited to 2,000 to 3,000 words (excluding the abstract, references, and figure legends). The reference list should not exceed 50 references, and the total combined number of figures and tables must be six or fewer. Multi-panel figures are acceptable.

Abstract

Case Series should be submitted with a structured abstract, consisting of no more than 250 words and the following four paragraphs:

- Background: Describes the clinical situation being discussed.
- Methods: Describes the clinical procedures (surgical and non-surgical) performed.
- Results: Describes the clinical results.

- Conclusion(s): Reports what authors have concluded, specifically clinical implications in practice situations.

Introduction

This section should include a critical review of the pertinent literature.

Case Description and Results

This section describes the cases, including all relevant data. For ease of presentation, tables describing longitudinal data in a chronological form may be useful. Carefully selected, high-quality clinical photographs in full color, as well as radiographs, are encouraged.

Discussion

This should include findings, put into perspective with respect to the field and literature. Unique arguments and new information gained should be summarized. Consideration of the clinical significance of the cases should be emphasized in all sections.

GUEST EDITORIALS

Guest Editorials may be invited or may be submitted from authorities in certain areas as a means of offering their perspective on one or more articles published in the *Journal of Periodontology*, or on other items of interest to the readership.

LETTERS TO THE EDITOR

Letters may comment on articles published in the *Journal of Periodontology* and should offer constructive criticism. If a letter comments on a published article, the author(s) will be provided 30 days to respond to the observations.

Letters to the Editor may also address any aspect of the profession, including education and training, new modes of practice, and concepts of disease and its management.

Letters should be brief (<1,000 words), focused on one or a few specific points or concerns, and can be signed by no more than five individuals.

Citations should be handled as standard references.

GENERAL FORMAT

Manuscripts must be submitted in Microsoft Word. Margins should be at least 1" on both sides and top and bottom and all text should be double-spaced. Materials should appear in the following order:

- Title Page
- Abstract (or Introduction) and Key Words
- Text
- Footnotes
- Acknowledgment(s)
- References
- Figure Legends
- Tables

Figures should not be embedded in the manuscript. Please see the *Journal of Periodontology* [Digital Art Guidelines](#) for more information on submitting figures.

Authors should retain a copy of their manuscript for their own records.

TITLE PAGE

The title page should contain:

1. a concise but informative title;
2. first name, middle initial, and last name of each author, with the highest academic degree and the current institutional affiliation, including department, for each (please use footnote symbols in the sequence *, †, ‡, §, ||, ¶, #, **, etc. to identify authors and their corresponding institutions);
3. disclaimers, if any;
4. the name and address (including fax number and e-mail) of the author responsible for correspondence (please indicate whether fax number and e-mail can be published);
5. word count and number of figures, tables, and references in the manuscript;
6. a short running title of no more than 60 characters, including spaces;
7. a one-sentence summary describing the key finding(s) from the study.

KEY WORDS

A maximum of six key words or short phrases, drawn from [MeSH documentation](#), to facilitate indexing should be listed below the abstract.

ACKNOWLEDGMENT(S) AND CONFLICTS OF INTEREST

Acknowledgment(s)

Following the Discussion, acknowledgments may be made to individuals who contributed to the research or the manuscript preparation at a level that did not qualify for authorship. This may include technical help or participation in a clinical study. Authors are responsible for obtaining written permission from persons listed by name. Acknowledgments must also include a statement that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author.

Conflicts of Interest

In the interest of transparency and to allow readers to form their own assessment of potential biases that may have influenced the results of research studies, the *Journal of Periodontology* requires that all authors declare potential competing interests relating to papers submitted for publication. Conflicts of interest are defined as those influences that may potentially undermine the objectivity or integrity of the research, or create a perceived conflict of interest.

Authors are required to submit:

1. A statement in the acknowledgments section of the manuscript that includes the source of any funding for the study, and defines the commercial relationships of each author. If an author has no commercial relationships to declare, a statement to that effect should be included. This statement should include financial relationships that may pose a conflict of interest or potential conflict of interest. These may include financial support for research (salaries, equipment, supplies, travel reimbursement); employment or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of the paper; and personal financial interests such as shares in or ownership of companies affected by publication of the research, patents or patent applications whose value may be affected by this publication, and consulting fees or royalties from organizations which may profit or lose as a result of publication. An example is shown below.
2. A conflict of interest and financial disclosure form for each author. A link to this electronic form will be e-mailed to each author after manuscript submission.

Conflict of interest information will not be used as a basis for suitability of the manuscript for publication.

Example of Conflict of Interest Statement

This study was supported by a grant from the Acme Implant Corporation, Seoul, Korea. Dr. Lee is on the scientific advisory board for Acme Implant Corporation and gives lectures sponsored by the company. Dr. Smith is a consultant and shareholder of the Brownstone Implant Corporation, Boston, Massachusetts. Dr. Wang is employed full-time as chief technical officer of the Acme Implant Corporation. Drs. Able, Kim, and Bruce report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text. A journal, magazine, or newspaper article should be given only one number; a book should be given a different number each time it is mentioned, if different page numbers are cited.

All references are identified, whether they appear in the text, tables, or legends, by Arabic numbers in superscript. Journal title abbreviations should be those used by the U.S. National Library of Medicine. If you are uncertain about the correct abbreviation for a journal title, please search for the journal at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog>.

The use of abstracts as references is strongly discouraged. Manuscripts accepted for publication may be cited and should include the manuscript's DOI, if known. Material submitted, but not yet accepted, should be cited in text as "unpublished observations." Written and oral personal communications may be referred to in text, but not cited as references. Please provide the date of the communication and indicate whether it was in a written or oral form. In addition, please identify the individual and his/her affiliation. Authors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication. Presented papers, unless

they are subsequently published in a proceedings or peer-reviewed journal, may not be cited as references. In addition, Wikipedia.org may not be cited as a reference. For most manuscripts, authors should limit references to materials published in peer-reviewed professional journals. In addition, authors should verify all references against the original documents. References should be typed double-spaced. Examples of references are given below. Authors are encouraged to consult EndNote for the *Journal of Periodontology's* preferred reference style.

Journals

1. Standard journal reference. Note: list all authors if six or fewer; when seven or more, list only first three and add et al. Kurita-Ochiai T, Seto S, Suzuki N, et al. Butyric acid induces apoptosis in inflamed fibroblasts. *J Dent Res* 2008;87:51-55.
2. Corporate author. Federation Dentaire Internationale. Technical report no. 28. Guidelines for antibiotic prophylaxis of infective endocarditis for dental patients with cardiovascular disease. *Int Dent J* 1987;37:235.
3. Journal paginated by issue. Card SJ, Caffesse RG, Smith BA, Nasjleti CE. New attachment following the use of a resorbable membrane in the treatment of periodontitis in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1989;9(1):59-69.
4. Non-English-language titles translated into English. Buchmann R, Khoury F, Hesse T, Müller RF, Lange DE. Antimicrobial therapy of peri-implant disease (in German). *Z Zahnärztl Implantol* 1996;12:152-157.

Books and Other Monographs

5. Personal author(s). Tullman JJ, Redding SW. *Systemic Disease in Dental Treatment*. St. Louis: The CV Mosby Company; 1983:1-5.
6. Chapter in a book. Rees TD. Dental management of the medically compromised patient. In: McDonald RE, Hurt WC, Gilmore HW, Middleton RA, eds. *Current Therapy in Dentistry*, vol. 7. St. Louis: The CV Mosby Company; 1980:3-7.
7. Agency publication. Miller AJ, Brunelle JA, Carlos JP, Brown LJ, Loë H. Oral Health of United States Adults. Bethesda, MD: National Institute of Dental Research; 1987. NIH publication no. 87-2868.
8. Dissertation or thesis. Teerakapong A. Langerhans' cells in human periodontally healthy and diseased gingiva. [Thesis]. Houston, TX: University of Texas; 1987. 92 p.

Electronic Citations

Note: DOIs are preferred for journal articles. If a DOI is not available, please provide a URL and access date.

9. Online-only article. Rasperini G, Acunzo R, Limiroli E. Decision making in gingival recession treatment: Scientific evidence and clinical experience. *Clin Adv Periodontics* 2011;1:41-52. doi:10.1902/cap.2011.100002.
10. Ahead of print. McGuire MK, Scheyer ET, Nevins M, et al. Living cellular construct for increasing the width of keratinized gingiva. Results from a randomized, within-patient, controlled trial [published online ahead of print March 29, 2011]. *J Periodontol*; doi:10.1902/jop.2011.100671.
11. Web sites. Centers for Disease Control and Prevention. Periodontal Disease. Available at: http://www.cdc.gov/OralHealth/topics/periodontal_disease.htm. Accessed September 29, 2010.

TABLES

Tables should be numbered consecutively in Arabic numbers in the order of their appearance in the text. A brief descriptive title should be supplied for each. Explanations, including abbreviations, should be listed as footnotes, not in the heading. Every column should have a heading. Statistical measures of variations such as standard deviation or standard error of the mean should be included as appropriate in the footnotes. Do not use internal horizontal or vertical rules. The submission system will easily read tables created with Word's table utility or when inserted into Word from Excel.

FIGURES

Please see the *Journal of Periodontology's* [Digital Art Guidelines](#) for detailed instructions on submitting high-quality images.

FOOTNOTES

Footnotes should be used only to identify author affiliations; to explain symbols in tables and illustrations; and to identify manufacturers of equipment, medications, materials, and devices. Use the following symbols in the sequence shown: *, †, ‡, §, ||, ¶, #, **, ††, etc.

SUPPORTING INFORMATION

The *Journal of Periodontology* includes supplementary/supporting information in the online Journal. All supplementary material should be called out in the text.

Supplementary Figures and Tables

Journal of Periodontology articles are limited to a combined total of six figures and tables in the print publication. Any additional figures and tables should be submitted as supplementary files. Each supplementary figure or table should be submitted as a separate file. Please follow the guidelines regarding resolution, format, etc. for printed figures (see **Figures** above) and tables (see above) when preparing supplementary figures and tables. In summary, each figure, table, or multimedia file should be uploaded separately and the file names should clearly identify the file (i.e., SupplementaryFigure1.tif, SupplementaryTable1.xls, etc.). If file size limitations prevent you from uploading your supplemental material, please e-mail jerry@perio.org.

Supplementary Videos

The Journal of Periodontology publishes short videos to supplement a paper when appropriate. Most standard video formats are accepted. Videos should be edited to remove extraneous material. Authors should adhere to OSHA regulations when preparing their videos. Please e-mail julie@perio.org for information on how to submit videos. If your video is accepted for publication, all authors will need to submit a video copyright form. This form can be found on ScholarOne Manuscripts in the upper right-hand corner under "Instructions & Forms."

Authors can create video abstracts for their articles through Wiley's partnership with Research Square. Visit the [Wiley](#) and [Research Square](#) websites for more information about this video option. Authors are also welcome to create and submit their own videos.

STYLE

Please follow the guidelines below when preparing a manuscript:

- Be sure to put the genus and species of an organism and journal names in the reference section in italics.
- Do not italicize common Latin terms such as *in vitro*, *in vivo*, e.g., or i.e.
- Use a block style; do not tabulate or indent material.
- Refer to the newest edition of the [Glossary of Periodontal Terms](#) published by the American Academy of Periodontology for preferred terminology.
- Authors are encouraged to use the disease classification as outlined in the [Annals of Periodontology, volume 4](#) (1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions).
- Create equations as text, treating any mathematical symbols as special characters and assigning them the Symbol font.
- Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressure in millimeters of mercury. All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the metric system in terms of the International System of Units (SI). Description of teeth should use the American Dental Association (i.e., Universal) numbering system.
- Statistical methods should be described such that a knowledgeable reader with access to the original data could verify the results. Wherever possible, results should be quantified and appropriate indicators of measurement error or uncertainty given. Sole reliance on statistical hypothesis testing or normalization of data should be avoided. Data in as close to the original form as reasonable should be presented. Details about eligibility criteria for subjects, randomization, methods for blinding of observations, treatment complications, and numbers of observations should be included. Losses to observations, such as dropouts from a clinical trial, should be indicated. General-use computer programs should be listed. Statistical terms, abbreviations, and symbols should be defined. Detailed statistical, analytical procedures can be included as an appendix to the paper if appropriate.

AUTHORSHIP

Individuals identified as authors must meet all of the following criteria established by the International Committee of Medical Journal Editors: 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition, analysis, or interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; 3) final approval of the version to be published; and 4) agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. Once the *Journal of Periodontology* has received a manuscript, any changes in authorship must be e-mailed to jerry@perio.org and must contain the signature of the author who has been added or removed from the paper. Authors who are added must submit a conflict of interest and financial disclosure form (see below).

Conflict of Interest and Financial Disclosure Form

A conflict of interest and financial disclosure form must be submitted by each author. A link to this electronic form will be e-mailed to each author after manuscript submission. Due to this, **all authors are required to have accounts with valid e-mail addresses in ScholarOne Manuscripts** and be listed as authors for the submitted paper. Submitting authors are able to create accounts for co-authors.

CLINICAL TRIALS

If your manuscript is reporting a randomized clinical trial, you are required to submit a **CONSORT checklist** with your manuscript. More information can be found at www.consort-statement.org. All clinical trials must be registered prior to submission to the Journal of Periodontology at one of the registration sites listed below. The registration number and date of registration should be included in the Materials and Methods section. **Starting January 1, 2016, all clinical trials must be registered prior to initiation (i.e., recruitment) of the trial.**

Please see <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/about-studies/learn#WhatIs> for more information regarding clinical trials.

- U.S. National Institutes of Health Clinical Trials Registry - <http://www.clinicaltrials.gov>
- EU Clinical Trials Register - <https://www.clinicaltrialsregister.eu>
- WHO International Clinical Trials Registry Platform - <http://www.who.int/ictrp/en>

ANIMAL AND HUMAN TRIALS

All manuscripts reporting the use of human subjects must include a statement that the protocol was approved by the author's institutional review committee for human subjects **AND** that the study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2013. Do not use any designation in tables, figures, or photographs that would identify a patient, unless written consent from the patient is submitted.

For research involving the use of animals, it is necessary to indicate that the protocol was approved by the author's institutional experimentation committee or was conducted in accordance with guidelines approved by the Council of the American Psychological Society (1980) for the use of animal experiments.

PRODUCT IDENTIFICATION

Use of brand names within the title or text is not acceptable, unless essential when the paper is comparing two or more products. When identification of a product is needed or helpful to explain the procedure or trial being discussed, a generic term should be used and the brand name, manufacturer, and location (city/state/country) cited as a footnote.

REVISED MANUSCRIPTS

Revised manuscripts should be submitted online at **ScholarOne Manuscripts** by the same author who submitted the original manuscript. Authors have 30 days to submit a revision. Revisions should adhere to the same requirements as original submissions. Additionally:

1. A detailed response to each reviewer comment for the original manuscript should be included. This response should also describe what changes were made in the manuscript to address each comment in the reviews.
2. Only the most recent version of each file should be uploaded. You may have to delete older files from the Author Center.

3. Please Any modified or added text must be highlighted in yellow in the revised manuscript.

4. Figures and tables should be resubmitted with revised manuscripts, even if they were not revised.

REVIEW PROCESS

Peer Review

The *Journal of Periodontology* is a peer-reviewed publication. All manuscripts are submitted to a minimum of two reviewers and, when appropriate, to a statistical reviewer. Authors are given reviewer comments and additional information or observations as the Editor believes would be helpful. Revised manuscripts are due within 30 days of receipt of the Editor's communication.

MANUSCRIPT ACCEPTANCE

All manuscripts accepted for publication become the property of the American Academy of Periodontology. If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to log in to Author Services where, via the Wiley Author Licensing Service (WALS), they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper. Once all forms are received by the editorial office, an unedited version of the accepted manuscript will appear online ahead of print on the journal's website. Once a manuscript is online ahead of print, it is fully citable based on the Digital Object Identifier (DOI) assigned to the manuscript. Manuscripts will be copyedited, published online, and printed in an issue of the *Journal of Periodontology* approximately 4 to 6 months after acceptance.

Copyright Transfer Agreement (CTA)

If the OnlineOpen option is not selected, the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the [Copyright FAQs](#).

OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected, the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

- Creative Commons Attribution Non-Commercial License
- Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License
- Research Councils UK (RCUK) and Wellcome Trust authors will use the Creative Commons Attribution License

Please visit the terms and conditions of these open access agreements [here](#).

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK), you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and RCUK requirements. For more information on this policy and the journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Reprints

Corresponding authors may purchase reprints at the time pages are received for proofreading.

Funding Agency Requirements

Consistent with current policies, authors who have papers based on funded research accepted for publication in the *Journal of Periodontology* may make their final accepted paper or published article available to agency depositories. However, authors should indicate that the paper may not be released publicly until 12 months following final publication in an issue.

Authors are responsible for complying with all funding agency requirements.

QUESTIONS

Inquiries regarding current submissions should be sent to: Editorial Specialist, Journal of Periodontology, 737 North Michigan Avenue, Suite 800, Chicago, IL 60611-6660. Telephone: 312/573-3255; e-mail: jerry@perio.org.

Production queries regarding accepted papers can be emailed to jperprod@wiley.com.

