



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

RAÍSSA SILVA BACELAR DE ANDRADE

**A DIETA HIPERCALÓRICA PODE AGRAVAR A ESTEATOSE CAUSADA
PELA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS?**

**PARNAÍBA - PI
2018**

RAÍSSA SILVA BACELAR DE ANDRADE

**A DIETA HIPERCALÓRICA PODE AGRAVAR A ESTEATOSE CAUSADA
PELA PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS?**

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

Linha de Pesquisa: Farmacologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos.

PARNAÍBA - PI

2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

A553d Andrade, Raíssa Silva Bacelar de.
A dieta hipercalórica pode agravar a esteatose causada pela
periodontite experimental em ratos? [manuscrito] / Raíssa Silva Bacelar
de Andrade. – 2018.
59 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do
Piauí, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos.

1. Periodontite. 2. Inflamação. 3. Doenças Periodontais. 4. Fígado.
5. Dieta. I. Título.

CDD: 617.632

RAÍSSA SILVA BACELAR DE ANDRADE

A DIETA HIPERCALÓRICA PODE AGRAVAR A ESTEATOSE CAUSADA POR
PERIODONTITE EXPERIMENTAL EM RATOS?

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

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Joilson Ramos de Jesus
Instituto de Educação Superior do Vale do Parnaíba

Prof. Dr. Marcus Vinícius Oliveira Barros de Alencar
Universidade Federal do Piauí

DEDICATÓRIA

Tenho o prazer de dedicar este trabalho ao nosso Pai Criador, o qual criou minha vida e de todos que amo e a toda a força celestial que contribuiu para minha vida até aqui.

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos vão primeiramente a DEUS, a todos os espíritos bons que colocou ao meu redor e a todo o desenho que fez para minha vida até aqui. Minha gratidão é imensa, pela força que me fez descobrir dentro de mim, por ter me possibilitado ter o melhor orientador e os melhores amigos de laboratório e de vida.

Ao meu orientador, professor Daniel Fernando Pereira Vasconcelos, você é show! Sabe ser responsável e descontraído ao mesmo tempo, o que não nos intimida a confiar nele para guiar nossa vida acadêmica. Obrigada por tudo, pelas oportunidades e pela compreensão e calma de sempre!

Aos meus pais, Jorge Luiz Araújo de Andrade e Zuleide Silva Bacelar de Andrade, que durante toda a vida ensinaram-me que o estudo é um dos caminhos mais justos e honrados de conseguir algo na vida. Amo vocês!

Ao meu amor João Victor, que entrou na minha vida num momento tão importante e me faz sentir capaz e compreende minha ausência quando preciso escrever. Amo muito ter você comigo!

Aos meus cachorros (sim!), Pérola e Otto, por serem fontes de luz e serenidade em todos os momentos. Amor sem medida!

Aos meus amigos de LAPHIS! Graças a eles minha vida se tornou muito mais colorida e a pesquisa se tornou um prazer, justamente por estar ao lado de pessoas tão maravilhosas: Larissa dos Santos Pessoa, Luiz Felipe de Carvalho França, David di Lenardo, Felipe Rodolfo Pereira da Silva, Ayane Araújo Rodrigues, Pedro Henrique Sales de Oliveira, Joaquina dos Santos Carvalho, André dos Santos Carvalho, Victor Brito Dantas Martins, Bruno Almeida Arrais Landim, Juliana Gomes Galeno, Maria Luísa Lima Barreto (Malu), Luana da Silva Rodrigues, Antônio de Pádua Rocha Nóbrega Neto, Hélio Mateus Silva Nascimento, Even Herlany Pereira Alves, Alan Leandro Carvalho de Farias e Victor Lucas Ribeiro Lopes. Como é bom estar com vocês e lembrar que dentro ainda somos crianças!!! Sem vocês também não teria

vencido o desafio de ser uma dentista adentrando o meio biomédico, e, para isso, agradeço especialmente ao Luiz Felipe, que sempre me ensinou tudo que quis saber com muita disposição.

Não poderia deixar de agradecer aos meus colegas de trabalho de Joaquim Pires, em especial a minhas auxiliares Jesus e Nazaré, que são parte essencial da minha vida. Sem a força e incentivo de vocês alguns momentos de agonia teriam sido muito piores.

E a todos os funcionários da Universidade Federal do Piauí pelo suporte.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem ilustrativa das estruturas periodontais e da periodontite. Do lado esquerdo, observa-se o dente saudável, enquanto do lado direito, um dente com doença periodontal instalada. 18
- Figura 2.** Imagem histológica do fígado, evidenciando os hepatócitos (estrelas) organizados em cordões, formando o lóbulo hepático, os capilares sinusoides (CS), que se reúnem na veia central (VC). 25
- Figura 3.** Avaliação clínica do modelo de periodontite induzida por ligadura. 38
- Figura 4.** Representação gráfica dos parâmetros clínicos. Os gráficos **A** e **B** mostram, respectivamente, os valores de Índice de Sangramento Gengival e Mobilidade, onde ambos os grupos experimentais mostram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. 39
- Figura 5.** Medidas de altura óssea alveolar e Profundidade de Sondagem. **A, B** e **C** representam a diferença morfométrica do osso alveolar. **A:** grupo controle, sem alteração. **B** e **C:** grupos periodontite e hipercalórico + periodontite apresentando perda óssea alveolar. A figura **D** demonstra a diferença significativa de AOA dos grupos com periodontite em comparação com o controle. A figura **E** representa os dados de PS, mostrando aumento para os grupos com periodontite em relação ao grupo controle. Não há alterações significativas entre grupos com periodontite. 40
- Figura 6.** Aspectos histológicos do fígado. **A** - Representa o tecido hepático do grupo controle sem alterações histológicas. Ao redor da veia central encontram-se hepatócitos em conformação normal. **B** - Representa o tecido hepático do grupo periodontite demonstrando vários hepatócitos com perda da conformação, apresentando esteatose e congestão sanguínea na veia central (VC). **C** - Tecido hepático do grupo hipercalórico + periodontite. Os hepatócitos exibem 41

conformação em cordões alterada, congestão sanguínea (círculo) e presença de esteatose. A proporção de hepatócitos degenerados no grupo hipercalórico + periodontite apresentou-se superior ao observado no grupo periodontite. Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE). Aumento: 40x.

Figura 7. Dosagens bioquímicas do fígado. **A** – Os níveis de **MDA** 43 apresentaram-se aumentados no grupo Hipercalórico + Periodontite em relação aos demais grupos. **B** – Os níveis de **GSH** apresentaram-se estatisticamente diminuídos no grupo Hipercalórico + Periodontite quando comparado aos outros grupos. **C** – Os dados de **MPO** não mostraram diferença estatisticamente significante entre os grupos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características utilizadas para a determinação de cada escore do Índice de Sangramento Gengival.	33
Tabela 2. Avaliação histopatológica em escores do fígado. Os valores representados são a moda, os valores mínimos e máximos.	42
Tabela 3. Parâmetros de peso e marcadores sanguíneos	44

LISTA DE ABREVIATURAS

SM – Síndrome Metabólica

JAC – Junção Amelocementária

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

TNF – Fator de necrose tumoral

IL – Interleucina

LPS – Lipopolissacarídeos

AST – Aspartato aminotransferase

ALT – Alanina aminotransferase

RANKL – Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa beta

EROs – Espécies reativas de oxigênio

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

MDA – Malondialdeído

GSH – Glutathiona

QR – Quilomícrons remanescentes

APO – Apoproteína

VLDL– Lipoproteína de densidade muito baixa.

HDL – Lipoproteína de alta densidade

IDL – Lipoproteína de densidade intermediária

LDL– Lipoproteína de baixa densidade

AGL– Ácido graxo livre

TG – Triglicerídeos

REL – Retículo Endoplasmático Liso

AGP– Ácido graxo poli-insaturado

MPO – Mieloperoxidase

GLUT-4 – Transportador de glicose

DHGNA – Doença hepática gordurosa não alcoólica

RI – Resistência à insulina

EH – Esteatose Hepática

ISG – Índice de sangramento gengival

PS – Profundidade de sondagem

AOA – Altura óssea alveolar

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Tecidos periodontais	18
2.1.1 Gengiva	19
2.1.1.2 Ligamento periodontal	19
2.1.1.3 Cimento	20
2.1.1.4 Processo alveolar	20
2.2 Doença Periodontal	21
2.2.1 Gengivite	21
2.2.2 Periodontite	21
2.3 Relação entre a periodontite e doenças sistêmicas	22
2.4 Tecido hepático	24
2.4.1 Características macro e microscópicas	24
2.5 Metabolismo lipídico	25
2.6 Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)	27
2.6.1 Esteatose Hepática (EH)	27
2.7 Associação entre a doença periodontal e a esteatose hepática	29
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Tipo de estudo	32
4.2 Aspectos éticos	32
4.3 Animais	32
4.4 Delineamento experimental	32
4.5 Dieta hipercalórica	32
4.6 Indução da doença periodontal	33
4.7 Parâmetros clínicos avaliados	33
4.7.1 Índice de sangramento gengival	33

4.7.2 Medida de profundidade de sondagem (PS)	34
4.7.3 Mobilidade dentária	34
4.7.4 Medida de altura óssea alveolar (AOA)	34
4.8 Avaliação histopatológica do fígado	35
4.9 Dosagens	35
4.9.1 Atividade de mieloperoxidase (MPO)	35
4.9.2 Níveis de glutathiona (GSH)	36
4.9.3 Níveis de malondialdeído (MDA)	36
4.10 Dosagens bioquímicas do soro	37
4.11 Análise estatística	37
5. RESULTADOS	38
5.1 Parâmetros clínicos: Índice de Sangramento Gengival e Mobilidade Dentária.	38
5.2 Altura Óssea Alveolar e Profundidade de Sondagem	39
5.3 Avaliação histopatológica	40
5.4 Níveis de MDA, GSH e MPO no fígado	42
5.5 Parâmetros de peso e níveis sanguíneos	43
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXO I – Aprovação do comitê de ética animal	
ANEXO II – Comprovante de submissão do artigo ao Journal of Periodontology	

RESUMO

A periodontite trata-se de uma doença inflamatória, de origem predominantemente bacteriana, que acomete os tecidos periodontais de proteção e fixação e influencia em alterações sistêmicas, dentre elas, alterações hepáticas. Alguns fatores, como a migração de bactérias e seus subprodutos, a resposta imunológica e o estresse oxidativo, com a consequente peroxidação lipídica, podem estar relacionados à influência da periodontite sobre outros sítios do corpo. No fígado, uma das alterações mais relacionadas à periodontite é a esteatose, definida como o acúmulo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos. A esteatose, por sua vez, também está relacionada à ingestão de alimentos ricos em gordura e açúcares (hipercalórica). O objetivo deste estudo foi avaliar a extensão e a severidade da esteatose hepática induzida por periodontite de acordo com a ingestão de dieta hipercalórica. Foram utilizadas 21 ratas divididas em três grupos, com sete animais cada: Controle; Periodontite (foi realizada apenas a indução da doença periodontal) e Hipercalórico + Periodontite (recebeu dieta hipercalórica e indução da doença periodontal). As ratas foram submetidas à análise dos seguintes parâmetros periodontais: Índice de sangramento gengival, medida de profundidade de sondagem, mobilidade dentária e altura óssea alveolar. No tecido hepático foram dosados os níveis de malondialdeído, glutathiona e a atividade de mieloperoxidase. As amostras de fígado também foram sujeitas à avaliação histopatológica. Por fim, foram dosados os níveis séricos de colesterol total, colesterol HDL, glicose, ácido úrico, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase. Os resultados dos parâmetros clínicos da doença periodontal demonstraram que o modelo de indução da doença foi eficaz. A avaliação histopatológica dos grupos com periodontite demonstrou a presença de esteatose hepática, diferentemente do observado no controle. Entretanto, o grupo Hipercalórico + Periodontite apresentou aumento no escore de esteatose com diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos Periodontite e Controle. Os níveis de malondialdeído, ácido úrico e alanina aminotransferase mostraram-se significativamente maiores no grupo Hipercalórico + Periodontite quando comparados aos demais grupos, enquanto glutathiona e colesterol HDL mostraram-se diminuídos. Em conclusão, nossos resultados demonstraram que a dieta hipercalórica agrava a esteatose hepática induzida pela periodontite.

Palavras-chave: fígado gorduroso, inflamação, doenças periodontais, dieta.

ABSTRACT

Periodontitis is an inflammatory disease, of predominantly bacterial origin, that affects the periodontal tissues of protection and fixation and influences in systemic alterations, among them, hepatic alterations. Some factors, such as the migration of bacteria and their byproducts, the immune response and oxidative stress, with consequent lipid peroxidation, may be related to the influence of periodontitis on other sites in the body. In the liver, one of the changes most related to periodontitis is steatosis, defined as the accumulation of lipids in the hepatocyte cytoplasm. Steatosis, in turn, is also related to the intake of foods rich in fat and sugars (high-fat). The objective of this study was to evaluate the extent and severity of periodontitis-induced hepatic steatosis according to the intake of a high-fat diet. Twenty-one rats were divided into three groups, with seven animals each: Control; Periodontitis (only induction of periodontal disease) and High-fat + periodontitis (received high-fat diet and induction of periodontal disease). The rats were submitted to analysis of the following periodontal parameters: gingival bleeding index, depth of probing, dental mobility and alveolar bone height. In the hepatic tissue, the levels of malondialdehyde, glutathione and myeloperoxidase activity were measured. Liver samples were also subjected to histopathological evaluation. Finally, serum levels of total cholesterol, HDL cholesterol, glucose, uric acid, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase were measured. The results of the clinical parameters of periodontal disease demonstrated that the disease induction model was effective. The histopathological evaluation of the groups with periodontitis demonstrated the presence of hepatic steatosis, differently from that observed in the control. However, the High-fat + Periodontitis group had an increase in the steatosis score with a statistically significant difference in relation to the Periodontitis and Control groups. The levels of malondialdehyde, uric acid and alanine aminotransferase were significantly higher in the High-fat + Periodontitis group when compared to the other groups, whereas glutathione and HDL cholesterol levels were decreased. In conclusion, our results demonstrated that the high-fat diet aggravates hepatic steatosis induced by periodontitis.

Keywords: fatty liver, inflammation, periodontal diseases, diet.

1. INTRODUÇÃO

A periodontite, marcada pela inflamação gengival e subsequente destruição tecidual e reabsorção óssea é uma das doenças inflamatórias crônicas mais prevalentes no mundo (30-50% da população mundial), sendo que 10% da população mundial é acometida por sua forma severa (IRIE et al., 2017). Fatores biológicos e estilo de vida, incluindo tabagismo, etilismo e estresse, são considerados como predisponentes para o desenvolvimento da doença. Entretanto, o desenvolvimento do processo inflamatório depende da interação entre bactérias no sítio de infecção e seus subprodutos (lipopolissacarídeos e proteinases), os quais são responsáveis pela progressão dessa forma de doença periodontal (OLIVEIRA et al., 2016; HAN et al., 2016). É notória a complexidade da patologia, que provou estar relacionada a outras doenças sistêmicas, como a doença arterial coronariana (SHINGAL; RAI, 2017), o acidente vascular cerebral (HAN et al., 2016) e diabetes mellitus tipo 2 (PERSSON, 2017).

Recentemente, vem sendo estudada a relação entre a doença periodontal e as diversas formas de doenças hepáticas, como esteatose, esteatohepatite e fibrose (HAN et al., 2016). Segundo estudos de Vasconcelos et al. (2017), os efeitos sistêmicos da periodontite induzida estão relacionados a alterações nos tecidos hepáticos, como a esteatose microvesicular, provavelmente causada por um aumento do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica. Os achados desse estudo implicaram uma associação entre a diminuição dos pericitos e a doença hepática causada pela periodontite induzida por ligaduras em ratos. Um estudo coorte realizado na Pomerânia também sugeriu a periodontite como um fator de risco para o desenvolvimento da esteatose hepática (AKINKUGBE et al., 2017). Esta última, também conhecida como doença hepática gordurosa não-alcoólica (DHGNA), trata-se do acúmulo de lipídios nos hepatócitos, em pelo menos 5% do total de células do tecido hepático.

Atualmente, 20-30% da população adulta mundial apresenta excesso de gordura hepática, aumentando para 57-74% em indivíduos obesos (MILIC; STIMAC, 2012). A doença se inicia com esteatose hepática e pode, eventualmente, progredir para esteatohepatite não-alcoólica (HAN et al., 2016). A DHGNA é um problema entre pacientes obesos adultos e jovens que se caracteriza como uma síndrome de etiologia multifatorial, na qual a obesidade é o fator associado mais comum (SHOELSON et al., 2007). Além disso, apresenta amplo espectro de alterações histológicas hepáticas.

Inicialmente se observa infiltração hepática de gordura (esteatose), podendo evoluir para atividade inflamatória e necrose, com ou sem fibrose perissinusoidal (esteato-hepatite), fibrose avançada e cirrose (PAPANDREOU et al., 2007; PALEKAR et al., 2006; DUARTE et al., 2011) . O diagnóstico precoce da esteatose hepática é de suma importância pelo fato de que 28% dos pacientes que evoluem para esteato-hepatite podem chegar à cirrose e ao carcinoma hepático com alto risco de necessitar de transplante hepático (DUARTE et al., 2011).

A esteatose hepática está intrinsecamente relacionada à dieta rica em gordura e açúcares. O consumo de dietas com alto teor calórico ou alto teor de gordura está associado também a uma vida sedentária, aumentando o risco de desenvolver doenças associadas a distúrbios metabólicos, como obesidade e síndrome metabólica (SM) (AUBERVAL et al., 2014). A SM é um conjunto de condições relacionadas a deficiência no metabolismo de certos alimentos e vem se tornando um problema de saúde pública. Dentre os fatores associados à SM, pode-se citar: tolerância à glicose prejudicada ou resistência à insulina, alteração da pressão arterial, dislipidemia, alterações cardiovasculares e obesidade central (CHEZZI et al, 2012).

A tríade obesidade, SM e DHGNA está relacionada ao estilo de vida ocidental, com dieta composta essencialmente por alimentos processados e bebidas doces (LONGATO, 2013). Sabe-se que a ingestão total de calorias altas está associada à esteatose, e vários estudos têm sido focados no papel de nutrientes específicos, como gorduras saturadas e carboidratos, no desenvolvimento e transição da doença (TOSHIMITSU et al., 2007; TETRI et al., 2008).

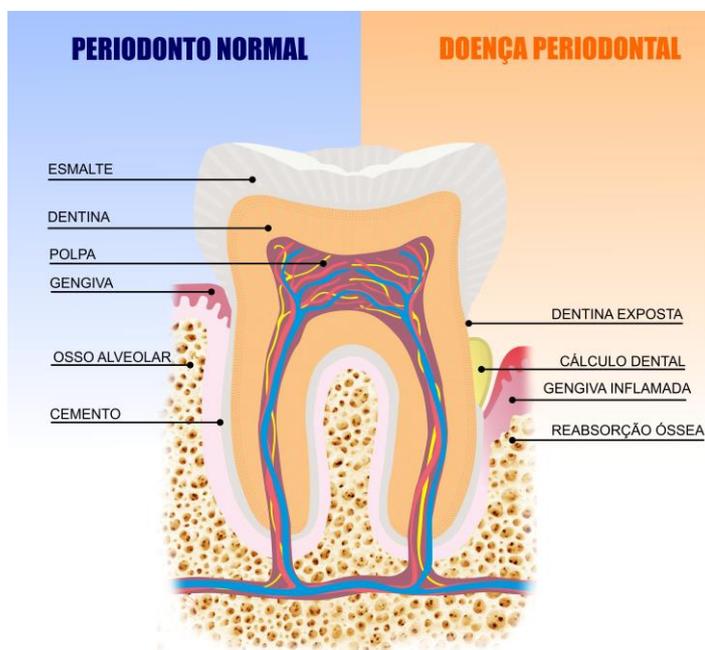
Considerando que a periodontite provoca a esteatose hepática e modelo animal, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da dieta na potencialização desta patologia em ratos com periodontite induzida, tendo em vista a carência de estudos demonstrando essa associação e o problema de saúde pública que configuram ambas a periodontite e a DHGNA.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Tecidos Periodontais

O periodonto consiste em uma estrutura de tecidos de recobrimento e suporte do dente: gengiva, ligamento periodontal, cimento e osso alveolar. Está dividido em duas partes: a gengiva, que constitui o *periodonto de proteção*, e o *periodonto de sustentação ou fixação*, composto por ligamento, periodontal, cimento e osso alveolar (NEWMAN et al., 2007). Cada um desses componentes apresenta composição, localização e função diferentes, entretanto atuam consoantes, formando os tecidos de revestimento e sustentação dos dentes. Os constituintes do periodonto fornecem base para a fixação e ancoragem, permitindo movimentos mínimos do dente durante a mastigação. Todo este sistema funcional proporciona uma correta articulação entre dente e osso alveolar, conferindo resistência no desempenho da sua função (GOUVEIA, 2009).

Figura 1. Imagem ilustrativa das estruturas periodontais e a periodontite. Do lado esquerdo, observa-se o dente saudável, enquanto do lado direito, um dente com doença periodontal instalada.



Fonte: autoria própria com o auxílio do *software* Corel Draw.

2.1.1 Gengiva

Em um adulto, a gengiva normal (Figura 1) recobre o osso alveolar e a raiz do dente em um nível coronal à junção amelocementária (JAC – junção entre o esmalte e o cimento) (WANG et al., 2005). É classificada como tecido epitelial de revestimento estratificado pavimentoso não queratinizado. A gengiva possui uma lâmina própria constituída de tecido conjuntivo predominantemente composto por colágeno, proteoglicanas e fibronectina (BARTOLD; NARAYANAN, 2006). É dividida anatomicamente em três porções: marginal, inserida e interdental, cada uma com sua respectiva estrutura, contudo realizando a mesma função: proteção contra danos mecânicos e microbianos (ANAIMO; TALARI, 1976; GARIB et al., 2010).

A gengiva marginal, ou livre ou não inserida, é a porção terminal ou borda da gengiva que circunda o dente, de maneira similar a um colarinho. Usualmente mede cerca de 1mm de espessura, formando assim a parede de tecido mole do sulco gengival e pode ser destacada da superfície do dente por uma sonda periodontal (WANG et al., 2005). O sulco gengival é o espaço ao redor do dente, limitado de um lado pela superfície dentária e, do outro, pelo recobrimento epitelial da gengiva marginal. A mensuração da profundidade dessa região anatômica é um parâmetro clínico importante para avaliar a gravidade da doença periodontal. Sob condições normais, a medida dessa região é próxima a zero milímetros (BALBINO et al., 2015).

A gengiva inserida é contínua com a gengiva marginal. É firme, resiliente e firmemente aderida ao periósteo subjacente. A porção vestibular da gengiva inserida se estende até a mucosa oral, encontrando-se com ela e formando a junção mucogengival. Enquanto isso, a gengiva interdental ocupa a área interdental, correspondendo ao contorno da gengiva entre um dente e outro (DE OLIVEIRA, 2001).

2.1.2 Ligamento Periodontal

O ligamento periodontal (Figura 1) é composto por um tecido conjuntivo ricamente vascularizado e celular que circunda a raiz do dente e a liga à parede interna do osso alveolar. Sua espessura média é 0,2mm, podendo variar (MCCULLOCH et al., 2000). Os elementos mais importantes do ligamento periodontal são as fibras principais, de natureza colágena, as quais se dispõem em feixes e seguem um curso ondulado quando vistas em cortes longitudinais. As porções terminais das fibras que se inserem no cimento e no osso são chamadas de fibras de Sharpey (WANG et al., 2005).

As células mais abundantes no ligamento periodontal são os fibroblastos, pois o ligamento periodontal é um tipo de tecido conjuntivo em que ocorre rápida renovação (turnover) e remodelação dos constituintes da matriz. Outros tipos celulares também estão presentes, sendo estes: células indiferenciadas, restos epiteliais de Malassez e as células que margeiam os dois tecidos adjacentes (osteoblastos, cementoblastos e odontoclastos). Além destas, outras células do tecido conjuntivo em geral estão presentes, bem como os elementos do sistema imune (DE LACUEVA FRANÇA, 2013).

Dentre as principais funções do ligamento periodontal, podem-se destacar: funções físicas (suporte e recepção de forças oclusais), formadora, nutritiva e sensorial (WANG et al., 2005).

2.1.3 Cimento

O cimento (Figura 1) é um tecido mesenquimal calcificado e avascular que forma a camada mais externa da raiz anatômica, dividindo-se em dois tipos principais: acelular (primário) e celular (secundário) (WANG et al., 2005). O cimento acelular é o primeiro a ser formado, antes de o dente alcançar o plano oclusal, e recobre o terço cervical, ou aproximadamente metade da raiz; ele não contém células (SIMPSON, 1965). Já o cimento celular, formado após o dente atingir o plano oclusal, é mais irregular e contém células (cementócitos) em lacunas que se comunicam entre si através de um sistema de canalículos. O cimento celular é menos calcificado que o acelular (ISHIKAWA et al., 1964).

Em sua composição, estão também presentes células denominadas cementoblastos, que recobrem as raízes dos dentes. Essas células protegem as raízes dentais das constantes reabsorções que ocorrem no osso. Esta proteção deriva da ausência de receptores na membrana dos cementoblastos para os mediadores que são responsáveis pela intensa remodelação óssea. Deste modo, para que as reabsorções dentárias ocorram, os cementoblastos devem ser removidos da superfície radicular (CONSOLARO et al., 2008).

2.1.4 Processo alveolar

O processo alveolar (Figura 1) é a porção da maxila e mandíbula que forma e suporta os alvéolos dentários. É um osso funcional que se forma à medida que o dente erupciona a fim de fornecer inserção óssea para o ligamento periodontal, ocorrendo

reabsorção óssea caso haja a perda de estruturas dentárias (WOLF; RATEISCHAK-PLUSS; RAITEITSCHAK, 2006).

O processo alveolar consiste nas seguintes regiões anatômicas: uma porção externa de osso cortical, lâmina dura (parede interna do alvéolo, constituída por osso fino e compacto) e trabéculas medulares (residente entre as camadas anteriores e composta por osso esponjoso) (WANG et al., 2005).

Biologicamente, o osso alveolar é semelhante ao tecido ósseo do restante do corpo, sendo composto também por colágenos tipos I, III e XII associados a cristais de hidroxiapatita, proteoglicanas e ácido glicosialico (SODEK; MCKEE, 2000). O osso alveolar sofre influência do hormônio paratormônio (VASCONCELOS et al., 2014) no entanto, diferentemente do restante do corpo possui uma rápida remodelação associada à erupção dental e subsequentemente às demandas funcionais da mastigação (ZORRO, 2014).

2.2 Doença Periodontal

2.2.1 Gengivite

A gengivite é uma das doenças mais prevalentes que afetam a população mundial, sendo caracterizada por uma inflamação superficial decorrente do acúmulo de bactérias na região do sulco gengival, caracterizada pela presença de eritema, edema, sangramento, sensibilidade e aumento do exsudato gengival, entretanto sem perda de inserção conjuntiva e óssea (ANTONINI et al., 2013; MONTERO et al., 2017). Apesar de apresentar alterações clínicas, o epitélio juncional se mantém intacto junto ao dente, sem perda do tecido conjuntivo de inserção. É reversível caso seus agentes etiológicos sejam removidos e controlados (ALMEIDA et al., 2006).

2.2.2 Periodontite

A doença periodontal (DP) é caracterizada por proliferação do epitélio juncional abaixo da junção cimento-esmalte, com formação de bolsa periodontal, além de contínua destruição do colágeno, ativação de fibroblastos e fagócitos, acúmulo de células polimorfonucleares e mononucleares, predominantemente linfoplasmocitárias, e reabsorção óssea alveolar (LIMA; LARA, 2013).

O agente etiológico primário da periodontite é o biofilme microbiano, composto principalmente por bactérias colonizadoras da superfície dentária. A constante modificação do microambiente local possibilita o desenvolvimento de uma placa bacteriana subgingival, caracterizada por uma microbiota principalmente gram-negativa anaeróbia e de espiroquetas, que constituem as principais bactérias periodontopatogênicas, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (antigamente referido como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*. O desenvolvimento de uma microbiota periodontopatogênica e a continuidade do acúmulo de placa bacteriana resultam em uma grande quantidade de produtos microbianos. Esta intensa carga antigênica no sulco gengival, por sua vez, ocasiona aumento na intensidade da resposta imunológica do hospedeiro (LIMA; LARA, 2013).

Fatores biológicos e estilo de vida, incluindo tabagismo, etilismo e estresse, são considerados como predisponentes para o desenvolvimento da doença. Entretanto, o desenvolvimento do processo inflamatório depende da interação entre bactérias no sítio de infecção e seus subprodutos (lipopolissacarídeos e proteinases), os quais são responsáveis pela progressão da periodontite (OLIVEIRA et al., 2016; HAN et al., 2016).

Como forma de tratamento, a raspagem e alisamento radicular (terapia periodontal convencional) são suficientes para prevenir o avanço da doença, mas, em alguns casos, há a necessidade de recontorno ósseo para devolver a anatomia da região. Os autoenxertos ósseos, aloenxertos e membranas também são utilizados para a regeneração tecidual na área afetada, em casos mais severos (SOHEILIFAR et al., 2016).

2.3 Relação entre a periodontite e doenças sistêmicas

Inúmeros são os estudos que buscam elucidar a relação entre a doença periodontal e doenças sistêmicas, resultando no desenvolvimento de um novo ramo de periodontia denominado "medicina periodontal" (HAN et al., 2016). A doença sistêmica mais citada na literatura quanto à associação com a periodontite é a diabetes mellitus. Juntamente com outras cinco complicações (doença cardiovascular cardio-cerebrovascular, nefropatia diabética, doença ocular diabética, neuropatia diabética e disfunção sexual diabética), a doença periodontal foi rotulada como a sexta complicação do diabetes

(HAN et al., 2016). Na verdade, não é só a prevalência da periodontite que está aumentada em indivíduos diabéticos, também a sua progressão e severidade é mais rápida e agressiva (ALMEIDA et al., 2006).

As doenças cardiovasculares e cerebrovasculares são outras patologias relacionadas à periodontite, sendo que fator comum para ambas é a aterosclerose, que consiste numa doença vascular progressiva caracterizada por um espessamento da camada sub-íntima de artérias musculares de médio calibre e grandes artérias elásticas, formando placas de ateromas. A teoria de que a aterosclerose passa por um processo inflamatório acentuou o interesse no papel que alguns agentes infecciosos possam participar no início ou mesmo na modelação da aterogênese (ACCARINI; GODOY, 2006).

Dentre os principais patógenos envolvidos, destacam-se a *Chlamydia pneumoniae*, o *Citomegalovírus* e o *Helicobacter pylori*. Nesta perspectiva, surgiu a hipótese da periodontite, como doença infecciosa, ter um papel na formação de ateromas. De fato, vários agentes patógenos periodontais foram detectados em placas de ateroma, nomeadamente *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* e o *Agreggatibacter actinomycetemcomitans*. Para além da detecção de material genético de patógenos periodontais, a periodontite tem sido associada a um aumento dos níveis de marcadores pró-inflamatórios, reconhecidos indicadores de risco para as doenças cardiovasculares, tais como a proteína C-reativa, a IL-6, o fibrinogênio e contagem de leucócitos (ALMEIDA et al., 2006).

É possível também relatar a associação da periodontite com a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e a pneumonia infecciosa. Os dentes e o periodonto podem servir de reservatório para infecção respiratória e a placa dentária talvez seja a fonte local importante de bactérias anaeróbicas, que causam pneumonia ou outros tipos de infecção respiratória (CANDEO et al., 2017; ALMEIDA et al., 2006). Vários mecanismos foram propostos para explicar o mecanismo pelo qual as bactérias orais participam da patogênese da infecção respiratória, incluindo bactérias periodontais inaladas oralmente, enzimas associadas à doença periodontal e citocinas (MACEDO et al., 2010). Um estudo conduzido por Terpenning e col. (2001) numa população idosa, demonstrou um aumento do risco de pneumonia por aspiração quando a bactéria *Porphyromonas gingivalis*, associada à DP, estava presente na placa bacteriana e saliva dos pacientes. Uma higiene oral insuficiente e a periodontite parecem estar,

estatisticamente, relacionadas com a DPOC, embora nenhum estudo tenha demonstrado a influência da DP na fisiopatologia desta patologia respiratória.

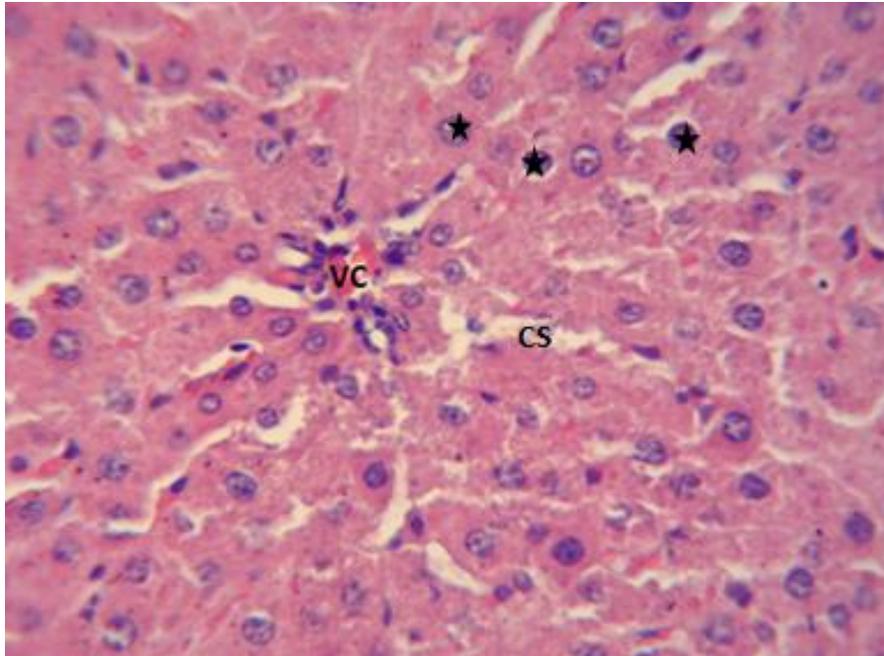
2.4 Tecido hepático

2.4.1 Características macro e microscópicas

O fígado é considerado o segundo maior órgão do corpo humano, sendo superado apenas pela pele. Está localizado na parte mais alta da cavidade abdominal, imediatamente abaixo do diafragma. Apresenta um formato de prisma, com ângulos arredondados e coloração vermelho-escuro. É formado por três superfícies: superior ou diafragmática, inferior ou visceral e posterior (ALDABA-MURATO et al., 2012). Sua anatomia é dividida em dois lobos principais (direito e esquerdo) e dois acessórios (quadrado e caudado) (GHAFARI; GHASSAM; PRAKASH, 2012). O órgão é dividido em setores e segmentos com suprimento sanguíneo e biliar independente. Trata-se do principal órgão de metabolismo e excreção. A maior função do fígado é a degradação de aminoácidos, carboidratos, lipídios e vitaminas, sua conversão metabólica e liberação para sangue e bile, a qual, por sua vez, desempenha um importante papel na digestão de lipídios. Além dessas funções, pode-se citar a eliminação de fármacos e toxinas (ALOIA, 2006).

Um tecido fibroso divide o órgão em unidades funcionais microscópicas, chamadas lóbulos, os quais são compostos por hepatócitos. Cada lóbulo é nutrido pelo sangue que entra pelas veias periféricas. Essas veias incluem pequenas ramificações das artérias hepáticas e ramificações da veia porta. O sangue entra em canais chamados sinusoides, onde se encontram todas as células do lóbulo. Os capilares sinusoides desembocam em uma veia localizada no centro do lóbulo chamada veia centrolobular, a qual é o ramo inicial da veia hepática. A veia centrolobular encontra-se no centro do lóbulo, sua parede é muito delgada, sendo constituída praticamente apenas por endotélio apoiado em fibras reticulares (VIEIRA, 2014). É importante também mencionar as estruturas conhecidas como espaços-porta, presentes no limite de alguns lóbulos hepáticos, as quais são formadas por vênulas, arteríolas (ramos da veia porta e artéria hepática), um ducto biliar, vasos linfáticos e nervos. Esse espaço pode também ser chamado de tríade porta, tendo em vista que seus componentes principais são a vênula, a arteríola e o ducto biliar (ALDABA-MURATO et al., 2012).

Figura 2. Imagem histológica do fígado, evidenciando os hepatócitos (estrelas) organizados em cordões, formando o lóbulo hepático, os capilares sinusóides (CS), que se reúnem na veia central (VC). Aumento de 40x. Coloração: Hematoxilina-Eosina.



Fonte: autoria própria.

2.5 Metabolismo lipídico

Os lipídios encontrados no tecido hepático apresentam diversas origens. As possíveis fontes que, juntamente com a lipogênese, contribuem com o estoque de lipídios no fígado são os ácidos graxos vindos dos tecidos periféricos a partir da lipólise e gorduras obtidas da dieta, que chegam ao órgão na forma de quilomícrons. Nos hepatócitos, os lipídios podem contribuir com os ciclos exógenos e endógenos, dependendo da rota que seguirem (EDER, 2009).

A via exógena do metabolismo lipídico está associada aos lipídios obtidos da dieta absorvidos no intestino. Para atravessar o lúmen intestinal no plasma, os lipídios são emulsificados e hidrolisados dentro do lúmen. Essa emulsificação ocorre através de ácidos biliares produzidos nos hepatócitos que possuem propriedades anfifílicas, permitindo a hidrolização dos lipídios por enzimas lipases. Os enterócitos absorvem os lipídios e os re-sintetizam em partículas de quilomícrons. Estes fazem parte de um grupo de macromoléculas conhecidas como lipoproteínas que são compostas por uma

fração lipídica (triglicerídeos, fosfolípidos, colesterol livre e esterificado) e outra protéica, as apoproteínas (Apo) (BASSANI, 2011; BECHMANN et al., 2012).

Os quilomícrons são secretados no sistema linfático e posteriormente penetram na corrente sanguínea, sofrendo a ação da enzima lipase lipoprotéica, presente na superfície das células endoteliais. A lipase realiza a digestão dos triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos, os quais são armazenados nos adipócitos. As moléculas resultantes deste processo são os quilomícrons remanescentes (QR), que acessam a corrente sanguínea e chegam ao fígado, onde são endocitados e metabolizados em colesterol e frações protéicas. A endocitose do QR ocorre através do reconhecimento da apoproteína E. Ao fim do metabolismo exógeno dos lípidos há a formação de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) (BASSANI, 2011; BECHMANN et al., 2012).

O metabolismo endógeno dos lipídios tem início com a produção de VLDL nos hepatócitos. A VLDL é uma lipoproteína formada a partir de ácidos graxos que podem ser derivadas da circulação, da própria síntese hepática e da hidrólise dos QR. É a principal lipoproteína responsável pelo transporte dos lipídios do fígado aos tecidos periféricos. À medida que os triglicerídeos são retirados das VLDLs, estas recebem colesterol esterificado das lipoproteínas de alta densidade (HDL) advindas dos tecidos periféricos. Esse processo é efetuado pela proteína de transferência de colesterol esterificado. Quando as VLDLs sofrem novamente a ação da lipase lipoprotéica, perdem 21% de triglicerídeos, resultando assim na formação das lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) e posteriormente como lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Estas recebem colesterol esterificado presentes nas HDLs em troca de triglicerídeos, apresentando menor concentração de triglicerídeo e maior teor de colesterol esterificado. As LDLs são a principal fonte de transporte e entrega do colesterol e triglicerídeos para os tecidos periféricos (MARTELLI, 2015; BASSANI, 2011; BECHMANN et al., 2012).

A síntese hepática dos ácidos graxos (lipogênese *de novo*- conversão de carboidrato em lípidos) é realizada no citoplasma dos hepatócitos para onde é transportada a acetilcoenzima A (acetil-CoA) formada na mitocôndria a partir do piruvato. A membrana interna da mitocôndria é impermeável a acetil-CoA, por isso seus carbonos são transportados na forma de citrato. Todas as reações são catalizadas pela ácido graxo sintetase em conjunto com acetil-CoA carboxilase e malonil-CoA. Os

ácidos graxos resultantes das reações se combinam por esterificação com o glicerol para formar triglicerídeos armazenáveis (MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2009; BECHMANN et al., 2012).

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

2.6 Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)

2.6.1 Esteatose hepática (EH)

Como componente principal da DHGNA, temos a esteatose hepática (EH), uma das alterações hepatocelulares mais frequentes (RABELO, 2010). Trata-se de uma condição que é caracterizada pelo acúmulo de lipídios no citoplasma dos hepatócitos, por vezes deslocando o núcleo dessa célula para a periferia (SOLER et al., 2008). O acúmulo de lipídios no tecido hepático se dá pelos seguintes meios: diminuição da síntese e secreção de lipoproteínas, aumento da lipólise no tecido adiposo, aumento do fluxo de ácidos graxos livres (AGL) no hepatócito, alteração da β -oxidação nas mitocôndrias dos hepatócitos e aumento na lipogênese hepática. Dentre essas alterações, a liberação de ácido graxo livre no fígado é responsável por quase dois terços do acúmulo de lipídeos (KRAWCZYK; BONFRATE; PORTINCASA, 2010; TILG; MOSCHEN, 2010; RODRIGUES, 2014).

A resistência a insulina (RI) é o principal fator predisponente para o acúmulo de lipídios no hepatócito. A ligação da insulina ao seu receptor celular estimula translocação das vesículas do transportador de glicose (GLUT-4) para a membrana celular, aumentando a entrada de glicose na célula. Na RI ocorre um bloqueio na fosforilação do receptor, impedindo a entrada da glicose. Quando há ausência de glicose como fonte de energia para a célula, ocorre o aumento da atividade lipolítica para utilização de lipídios como fonte alternativa de energia. A atividade lipolítica

umentada induz um maior fluxo de AGL no fígado, que se acumulam no citoplasma. A mudança na fonte energética também estimula a síntese lipídica nos hepatócitos. (PINTO et al, 2012; RODRIGUES, 2013).

A beta-oxidação costuma ocorrer nas mitocôndrias, mas devido ao excesso de AGL esse processo fica sobrecarregado, ocorrendo a liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que ativam vias alternativas, microsomal e peroxissomos, que potencializam sua produção. Com esse excesso de oxidantes, a capacidade antioxidante da célula se excede, acarretando o estresse oxidativo, o qual induz a peroxidação lipídica, que consiste na agressão dos ácidos graxos poli-insaturados (AGP) dos fosfolipídios de membrana por EROs (FRANÇA et al. 2013). O dano celular decorrente do estresse oxidativo resulta na ativação da resposta inflamatória (DOWMAN; TOMLINSON; NEWSOME, 2009), como a liberação de citocinas, em especial o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que, por sua vez, também induz a produção de EROs (FRANÇA et al. 2013).

O acúmulo de lipídios nos hepatócitos pode ser observado histologicamente como a presença de vacúolos, que permitem a classificação morfológica da esteatose em macrovesicular e microvesicular e, de acordo com a localização no órgão, pode ser focal ou difusa. A variante macrovesicular é a mais comum, marcada por hepatócitos constituídos por um grande e único vacúolo que desloca o núcleo para a periferia da célula; apresenta associação com a elevada ingestão de álcool, RI, obesidade e nutrição parenteral prolongada. A forma microvesicular é caracterizada pela presença de inúmeros e pequenos vacúolos no citoplasma celular; ocorre principalmente na gravidez, na intoxicação por tetraciclina e em algumas formas da hepatite fulminante em crianças (MARTELLI, 2010; RODRIGUES, 2014).

Na maioria dos indivíduos, a esteatose é diagnosticada após testes com marcadores de lesão hepática, como aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase (AST e ALT, respectivamente) e fosfatase alcalina; ultrassonografia ou tomografia computadorizada, que indicam a presença de um fígado gorduroso; biopsia hepática seguida de análise histológica, que, apesar do elevado custo e risco ao paciente, é o método considerado padrão ouro (SOLER et al., 2008; SEIXAS, 2010; SOUSA, 2012).

2.7 Relação entre a periodontite e a esteatose hepática

Recentes pesquisas epidemiológicas tem relacionado a periodontite e as doenças hepáticas. Um estudo coorte realizado na Pomerânia em 2017 sugeriu a periodontite como um fator de risco independente na etiologia da esteatose hepática (AKINKUGBE et al., 2017). Outros estudos demonstram que, em pacientes acometidos pela periodontite, os níveis séricos de AST, ALT e colinesterase estão aumentados (YAMAMOTO et al., 2010; GRØNKJÆR, 2015). No estudo de Tomofuji e col. (2007) foi realizada a indução da periodontite através da aplicação de lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) e proteases em ratos. A partir deste experimento foi observado que a inflamação periodontal e o estresse oxidativo resultante induziram a DHGNA. Além disso, estudos, como o de Carvalho et al. (2017), demonstraram que, em modelos murinos, a esteatose desenvolvida a partir da indução da doença periodontal é reversível após a remissão da doença oral.

Durante o desenvolvimento da periodontite, as bolsas periodontais profundas criam um ambiente subgingival de depósitos de bactérias, que levam a ulceração do tecido (TOMOFUJI et al., 2007). Essa lesão permite o acesso dos periodontopatógenos e seus produtos aos vasos da região com consequente disseminação para a circulação sistêmica. Na região gengival de um paciente com periodontite, devido à congestão sanguínea, é observado um aumento e uma extensão do número de vasos sanguíneos, este evento também pode facilitar o transporte do LPS para o sistema circulatório. Com o transporte do LPS ocorre uma estimulação amplificada da resposta imune para locais fora da região inicialmente lesionada. Esse fato explica o papel do LPS na lesão hepática observada em vários modelos animais (YAMAMOTO et al., 2010). Com a grande liberação de citocinas na doença periodontal, algumas delas, como o TNF- α , induzem a fosforilação dos receptores de insulina, impedindo que ela se ligue aos seus receptores (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Outro fator que explica a relação da esteatose com a periodontite é o estresse oxidativo presente na periodontite. As EROs liberadas, além de participarem no processo de recrutamento de citocinas, agridem os AGPs, dando início ao processo de peroxidação lipídica nas células. Como subproduto desse processo, temos vários aldeídos, dentre eles o malondialdeído (MDA), que se forma apenas através da peroxidação dos AGPs, as quais são oxidadas a fim de diminuir a resistência de suas ligações carbono-hidrogênio (ROLO; TEODORO; PALMEIRA, 2012).

Outro tecido bastante afetado pelo estresse oxidativo é o tecido adiposo. Os adipócitos secretam elevada quantidade de TNF- α , IL-6, IL-8 e a proteína 1 quimiotática dos macrófagos em resposta a essa injúria. O próprio tecido adiposo é responsável pelo manejo da resposta corporal à insulina (MAGGIONI, 2014; RODRIGUES 2014). A liberação de citocinas como resultado da ação bacteriana e suas endotoxinas e também através da estimulação dos adipócitos acarreta a migração de células inflamatórias que participam da liberação de enzimas como a mieloperoxidase (MPO). A MPO forma radicais livres e substâncias oxidantes difusíveis com atividade antimicrobiana devido à sua reação com o peróxido de hidrogênio, entretanto, devido a elevada inflamação na periodontite, há também uma intensa produção de MPO, ocasionando mais um dano oxidativo (FERREIRA et al., 2011). Esse intenso estresse oxidativo, por sua vez, traz como consequência a diminuição de antioxidantes naturais, como a glutathiona (GSH) que possui sua maior concentração no tecido hepático em comparação com outros tecidos. A diminuição de GSH contribui para a manutenção e a progressão da esteatose (CHEN et al., 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a extensão e severidade da esteatose hepática causada pela periodontite experimental com a ingestão de uma dieta hipercalórica em ratas.

3.2 Objetivos específicos

- Induzir a periodontite por meio da inserção de uma ligadura nos primeiros molares inferiores das ratas;
- Associar os danos periodontais às lesões hepáticas;
- Avaliar a esteatose entre os animais com indução de periodontite por ligadura por meio de parâmetros bioquímicos e histológicos;
- Avaliar os parâmetros clínico-inflamatórios (Índice de Sangramento Gengival, Profundidade de Sondagem e Mobilidade) na cavidade oral dos animais que receberam indução de periodontite;
- Mensurar os marcadores de estresse oxidativo e de inflamação no fígado dos animais;
- Determinar os níveis séricos dos marcadores bioquímicos de lesão hepática nas amostras sanguíneas dos animais;
- Classificar histologicamente em escores as amostras de fígado para avaliar a presença e extensão de esteatose, inflamação e necrose.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo experimental do tipo descritivo-analítico, realizado nas dependências do Laboratório de Análise e Processamento Histológico (LAPHIS) da Universidade Federal do Piauí, *campus* de Parnaíba.

4.2 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) sob o protocolo de nº 385/ 17 como parte de um projeto maior (aceitação do comitê em anexo).

4.3 Animais

Foram utilizadas 21 ratas da linhagem Wistar (espécie *Rattus norvegicus*), pesando entre $195 \pm 1,9$ g. Os animais foram mantidos em ciclo de 12h de luz / 12h escuridão, sendo mantidos a uma temperatura de 23 ± 2 °C, com livre acesso a água e alimentos. A eutanásia ocorreu de acordo com as recomendações da Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.4 Delineamento experimental

Foram criados três grupos, contendo sete animais cada:

- Controle (não recebeu dieta especial, nem houve indução de periodontite);
- Periodontite (foi realizada apenas a indução da periodontite);
- Hipercalórico + Periodontite (recebeu dieta hipercalórica e foi realizada a indução da periodontite).

4.5 Dieta Hipercalórica

A dieta hipercalórica utilizada se constituía em 80% de gordura vegetal¹ e 20% de sacarose² (RODRIGUES et al., 2018). Cada animal do grupo Hipercalórico +

¹ Bunge®, White Plains, Estados Unidos

² União®, São Paulo, SP, Brasil

Periodontite recebeu 0,5ml dessa dieta diariamente, durante 20 dias, por meio do processo de gavagem. Em estudo de Rodrigues et al. (2018), essa dieta demonstrou não causar o desenvolvimento de esteatose isoladamente.

4.6 Indução da doença periodontal

Previamente à indução, os animais foram pesados, receberam anestesia geral via intramuscular com 35 mg/kg de cetamina³ e 15 mg/kg de xilazina⁴. A indução da doença ocorreu com a inserção de um fio de nylon⁵ 3-0 circundando os primeiros molares inferiores das ratas (PESSOA et al., 2018).

Após 20 dias da indução da periodontite, ocorreu pesagem dos animais, avaliação clínica periodontal e coleta de sangue do plexo retro-orbital. Em seguida, os animais foram eutanasiados por overdose de solução anestésica. Após isso, foram coletados gengiva, mandíbulas e fígado dos animais, pesagem e armazenagem para posteriores análises bioquímicas e histológicas (PESSOA et al., 2018).

4.7 PARÂMETROS CLÍNICOS AVALIADOS

4.7.1 Índice de sangramento gengival (ISG)

Foi realizada a observação dos primeiros molares inferiores de todos os grupos por dez segundos e realizada classificação de acordo com Liu et al. (2012) em escores de 0 a 5 (Tabela 1).

Tabela 1. Características utilizadas para a determinação de cada escore do Índice de Sangramento Gengival.

Escore	Inflamação	Alteração de cor	Edema	Úlcera	Hemorragia
0	Não	Não	Não	Não	Não
1	Leve	Não	Não	Não	Não
2	Leve	Sim	Não	Não	Pontual (leve)
3	Moderada	Sim	Leve	Não	Para fora do sulco (moderada)

³ Francotar-Virbac®, Roseira, SP, Brasil

⁴ Rompum-Bayer®, São Paulo, SP, Brasil

⁵ Shalon®, Goiania, GO, Brasil

4	Severa	Sim	Grave	Sim	Para fora do sulco (moderada)
5	Severa	Sim	Grave	Sim	Espontânea (severa)

4.7.2 Medida de profundidade de sondagem (PS)

Foi utilizada uma sonda periodontal (ponta de 0,2 mm) para avaliação da profundidade de sondagem. A sonda foi inserida em três pontos para avaliação da medida (mésio-vestibular, disto-vestibular e médio-vestibular), que foi registrada em milímetros (LIU et al., 2012).

4.7.3 Mobilidade dentária

Foi realizada a avaliação da mobilidade dentária de acordo com os parâmetros descritos por Xu et al (2006). A mobilidade dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo foi classificada da seguinte forma: 0 = ausência de mobilidade, 1 = ligeira mobilidade (sentido vestibulo-palatino), 2 = mobilidade moderada (vestibulo-palatino e mésio-distal) e 3 = mobilidade severa (sentido mésio-distal, vestibulo-palatino e vertical).

4.7.4 Medida de altura óssea alveolar (AOA)

Após remoção do tecido gengival da região do colo do dente afetado com lâmina de bisturi nº 15C, as mandíbulas foram divididas, submetidas à coloração com solução de azul de metileno a 1% e fotografadas para análise da Altura Óssea Alveolar (AOA) em sua face lingual por meio de visualização em lupa de aumento de objetiva de 30x. Três examinadores devidamente calibrados e de forma cega executaram as medições. De acordo com o estudo de Liu (2012), utilizou-se o *software* de análise de imagens Image J (Image Processing and Analysis in Java)⁶ com a determinação de quatro medidas ao longo do dente, como se segue: AOA - 1, a distância foi obtida pela mensuração da altura da Junção Esmalte Cimento (JEC) até a Crista Óssea Alveolar (COA) na porção anterior (mesial) da raiz mesial do primeiro molar inferior; AOA - 2: a distância foi obtida pela mensuração da altura da JEC a COA, na porção média da face lingual da raiz mesial do primeiro molar inferior; AOA - 3, a distância foi obtida pela

⁶ Media Cybernetics®, Maryland, United States

mensuração da altura da JEC a COA, na porção média da face lingual da raiz intermediária do primeiro molar inferior; AOA – 4: a distância foi obtida pela altura da JEC a COA na porção média da face lingual da raiz distal do primeiro molar inferior.

Após as medições a seguinte fórmula foi utilizada para a obtenção do resultado final: $AOA = AOA -1 + AOA-2 + AOA -3/ + AOA-4$ (PESSOA et al., 2018).

4.8 Avaliação histopatológica do fígado

As amostras de fígado coletadas foram armazenadas em formaldeído tamponado a 10%. O processamento histológico das amostras seguiu os seguintes passos: desidratação com soluções crescentes de álcool etílico; diafanização com solução de xilol; inclusão, impregnação por parafina; microtomia, cortes das amostras incluídas em 5 µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina. A observação das lâminas ocorreu por meio de microscopia convencional⁷, seguida de capturação das imagens por campo (foram observados 16 campos por animal) das lâminas histológicas para avaliar os seguintes parâmetros: a) esteatose, b) inflamação, c) necrose (TURLIN et al., 2009). A esteatose foi avaliada semiquantitativamente, por meio da porcentagem de células com esteatose seguindo uma escala de 5 graus: 0, ausente ou presente em <5% de hepatócitos; +1, ≥ 5% e <25%; +2, ≥ 25% e <50%; +3, ≥ 50 % e <75%; e +4, ≥ 75% (YOUNOSSI et al., 2005). A avaliação da inflamação e da necrose seguiu a seguinte classificação: 0: nenhuma; 1: <2 focos/campo; 2: 2-4 focos/campo; 3: >4 focos/campo (MAGGIONI, 2014).

4.9 Dosagens

4.9.1 Atividade de Mieloperoxidase (MPO)

A mensuração da atividade da MPO consistiu no acúmulo de neutrófilos no tecido hepático proposto por Schierwagen et al. (1990). Resumidamente, 40 mg de tecido foram macerados e homogeneizados em 50 mg/mL de tampão de potássio contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Centrifugou-se o homogeneizado a 3.900 rpm durante seis minutos a 4 °C. A atividade de MPO foi realizada após a coleta do sobrenadante por meio da determinação da variação na absorbância em leitor de microplaca de ELISA no comprimento de onda de 450 nm,

⁷NOVA®, Piracicaba, SP, Brasil

utilizando o dicloridrato de O-dionisidina em reação com peróxido de hidrogênio a 1% (SCHIERWAGEN et al., 1990). A atividade da MPO foi mensurada em unidades/mg de tecido. Uma unidade da atividade de MPO foi definida pela conversão de 1 μ mol de peróxido de hidrogênio em água em 60 segundos a 24°C, de acordo com Chaves et al (2013). Os resultados foram expressos em unidade de MPO/mg de tecido.

4.8.2 Níveis de Glutathiona (GSH)

A concentração de GSH, peptídeo com efeito protetor presente no fígado, foi determinada de acordo com Ma et al. (2017) que consiste na reação do grupo sulfidril com 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB – reagente de Ellman) com o tiol livre, que resulta em um dissulfeto misto e ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. O produto resultante foi mensurado por meio de espectrofotometria (SILVA, 2009; ANDRADE, 2012). Foram pesados entre 50 a 100 mg das amostras de fígado e, em seguida, homogeneizadas em 5 mL de EDTA 0,02M gelado. Foram retirados 4,0 mL deste homogeneizado, que foi misturado com 3,2 ml de água destilada e 0,8 mL de ácido tricloroacético a 50%. As amostras foram agitadas e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. Do sobrenadante foi retirado 2,0 ml, neste foi acrescido 4mL de TRIS 0,4 M (pH 8,9) e 0,1 ml de DTNB 0,01 M. Depois de agitar a preparação, a absorvância foi medida a 412 nm num espectrofotômetro (SILVA, 2009; ANDRADE, 2012). Os dados foram expostos como μ g/g de tecido.

4.9.3 Níveis de Malondialdeído (MDA)

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

As amostras de fígado foram congeladas e estocadas imediatamente após a coleta e foram lavadas com soro fisiológico gelado (4° C), para remover vestígios de sangue. As amostras foram pesadas e homogeneizadas em cloreto de potássio (KCl) gelado a 1,15%, o que resultou em uma solução ácida com concentração de 10%. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada de cada amostra e acrescida 1,0 ml da solução aquosa de ácido

tiobarbitúrico (TBA) a 0,6% e 3,0 ml da solução de ácido fosfórico (H_3PO_4 , 1%). Logo após, a mistura foi colocada em banho fervente por 45 minutos, resfriada em banho de gelo e, em seguida, adicionados 4,0 ml de N-butanol. Seguidos dois minutos de agitação, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 3.000rpm. Por meio de espectrofotometria (comprimento de onda entre 520 nm e 535 nm), foi medida a absorvância da camada orgânica sobrenadante (fase butanólica). A concentração de TBARS foi expressa em nmol/g de tecido.

A diferença entre os valores obtidos de cada leitura, resultantes de cada comprimento de onda foi utilizada para calcular a concentração de TBARS, usando a regressão linear a partir de uma curva padrão (SILVA, 2009; ANDRADE, 2012).

4.10 Dosagens bioquímicas do soro

As amostras de sangue retiradas do plexo retro-orbital foram armazenadas e refrigeradas. Posteriormente foram centrifugadas para obtenção de 100 μ l de soro. Em seguida, foram realizadas as dosagens dos níveis dos marcadores de lesão hepática (AST e ALT), colesterol total, colesterol HDL, ácido úrico e glicose, sendo realizadas com a utilização de Kits Labtest⁸, seguindo as instruções do fabricante, e analisadas por espectrofotometria.

4.11 Análise estatística

Os dados foram expressos na forma de média/moda \pm desvio padrão e/ou mediana/moda \pm intervalo quartílico. Para avaliação da distribuição e normalidade dos dados foi utilizado o teste estatístico de *Shapiro-Wilk*. A diferença entre os grupos foi analisada por meio do teste de variância (ANOVA) e do teste de *Student-Newman-Keuls*, para os dados paramétricos, e do teste de *Kruskal-Wallis* para dados não paramétricos, seguido pelo teste de *Dunn* para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados no software GraphPad Prism 7.0⁹.

⁸ Labtest®, Belo Horizonte, MG, Brasil

⁹ GraphPad Software, Inc., Califórnia, EUA

5. RESULTADOS

5.1 Parâmetros clínicos: Índice de Sangramento Gengival e Mobilidade Dentária.

A avaliação clínica demonstrou haver alterações nos grupos onde foi induzida a periodontite, como: presença de inflamação gengival, acúmulo de placa, alteração da coloração dos tecidos moles, sangramento e edema podendo ser observadas na Figura 3. Além disso, os escores de ISG (Figura 4A) e a mobilidade dentária (Figura 4B) mostraram aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em ambos grupos periodontite e hipercalórico + periodontite em relação ao grupo controle, mas sem diferença entre si ($p > 0,05$). Com base nos resultados de ISG, os grupos controle, periodontite e hipercalórico + periodontite foram classificados nos scores 0, 4 e 3, respectivamente; já nos resultados de mobilidade dentária os resultados dos scores foram 1,3 e 2, respectivamente.

A imagem 3A mostra o dente molar inferior do grupo controle com periodonto saudável. A imagem 3B mostra o dente molar inferior do grupo periodontite com a presença da ligadura associada a edema e placa bacteriana ao redor do primeiro molar inferior. A imagem 3C mostra o dente molar inferior do grupo hipercalórico + periodontite com a presença de placa bacteriana, sangramento no sulco gengival e alteração de cor.

Figura 3. Avaliação clínica do modelo de periodontite induzida por ligadura.

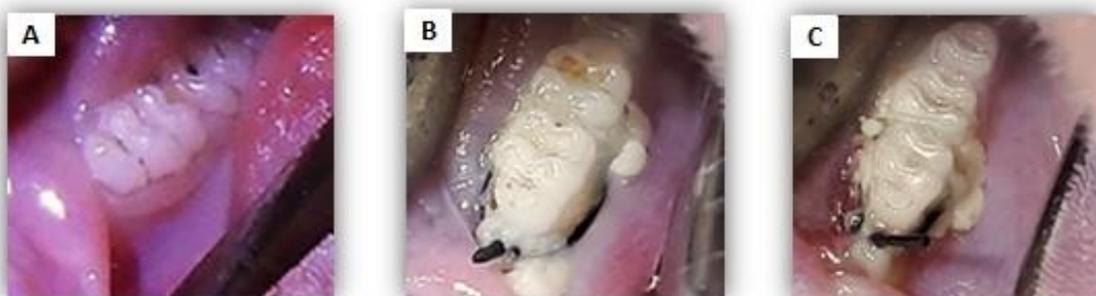
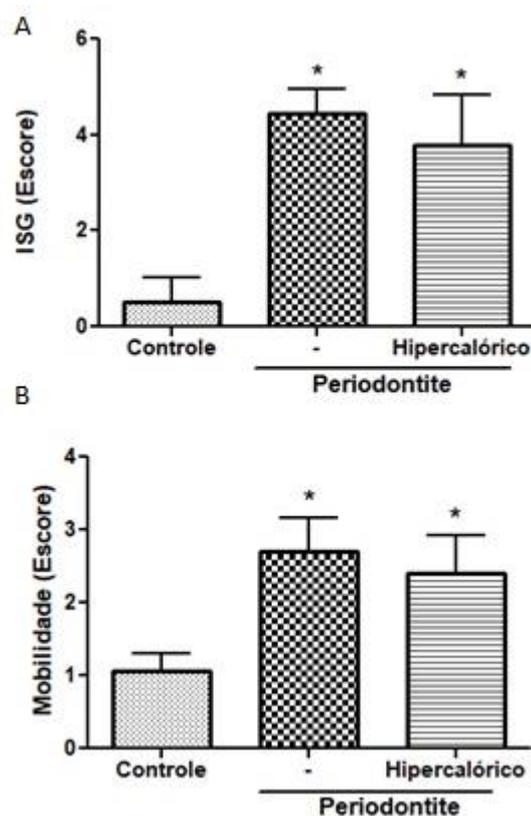


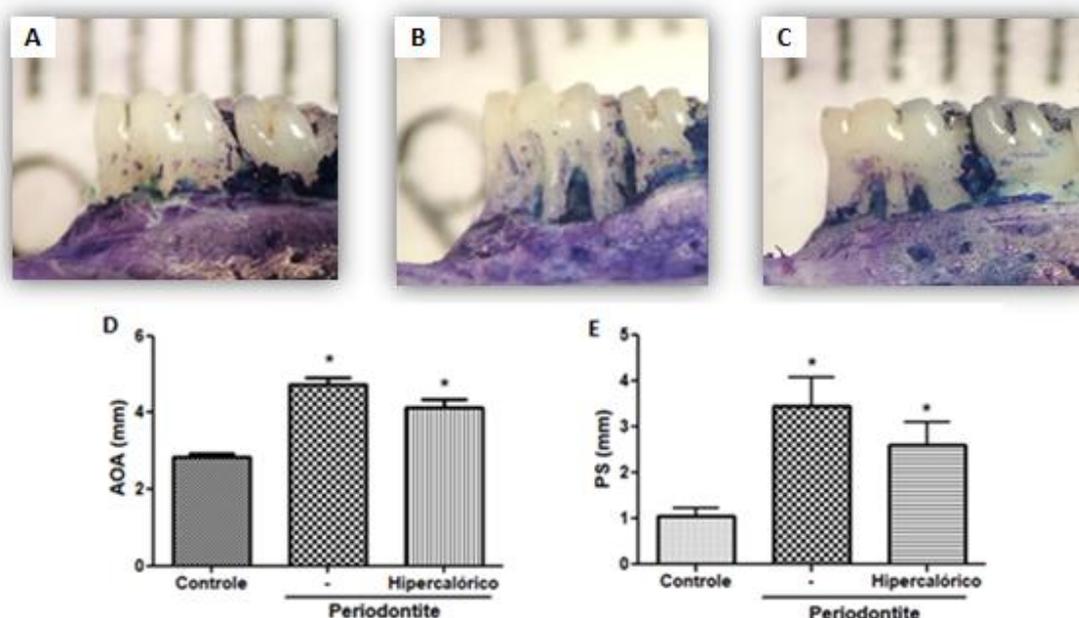
Figura 4. Representação gráfica dos parâmetros clínicos. Os gráficos **A** e **B** mostram, respectivamente, os valores de Índice de Sangramento Gengival (ISG) e Mobilidade, onde ambos os grupos experimentais mostram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.



5.2 Altura Óssea Alveolar (AOA) e Profundidade de Sondagem (PS)

Na figura 5, as imagens das mandíbulas coradas com azul de metileno foram utilizadas para fazer a medição da Altura Óssea Alveolar nos grupos Controle, Periodontite e Hipercalórico + Periodontite (figuras 5A, 5B e 5C, respectivamente). Pode-se observar a AOA (figura 5D) no grupo Controle ($2,8 \pm 0,1$), Periodontite ($4,7 \pm 0,2$) e Hipercalórico + Periodontite ($4,2 \pm 0,2$). Na mesma figura, os resultados de PS (figura 5E) no Controle ($1,0 \pm 0,04$), Periodontite ($3,4 \pm 0,1$) e Hipercalórico + Periodontite ($2,6 \pm 0,2$). Todos os resultados tiveram aumento significativo quando comparados ao grupo Controle ($p < 0,05$).

Figura 5. Medidas de altura óssea alveolar e Profundidade de Sondagem. **A, B e C** representam a diferença morfométrica do osso alveolar. **A:** grupo controle, sem alteração. **B e C:** grupos Periodontite e Hipercalórico + Periodontite apresentando perda óssea alveolar. A figura **D** demonstra a diferença significativa da AOA dos grupos com periodontite em comparação com o controle. A figura **E** representa o gráfico de PS, mostrando aumento para os grupos com periodontite em relação ao grupo controle. Não há alterações significativas entre grupos com periodontite.



* $p < 0.05$ indica comparação ao grupo controle.

5.3 Avaliação Histopatológica

A Figura 6 representa a análise histológica em sua coloração com hematoxilina e eosina (HE). Na figura 6A, observa-se o tecido hepático do grupo controle, no qual os hepatócitos apresentam conformação normal. O grupo Periodontite, representado na figura 6B e o grupo Hipercalórico + Periodontite (Figura 6C) apresentaram hepatócitos com esteatose do tipo microvesicular e núcleos periféricos, além da diminuição da organização em forma de cordões. Conforme a tabela 2, a análise dos escores de esteatose, inflamação e necrose dos tecidos hepáticos de ambos os grupos com periodontite demonstrou índices elevados de esteatose em comparação ao grupo controle [0 (0-1), 2 (1-3), 3 (1-3), grupos controle, periodontite e hipercalórico +

periodontite, respectivamente; $p < 0,05$]. No entanto, em termos de inflamação e necrose, nenhum dos grupos apresentou diferença estatisticamente significativa.

Figura 6. Aspectos histológicos do fígado. **A** - Representa o tecido hepático do grupo controle sem alterações histológicas. Ao redor da veia central encontram-se hepatócitos em conformação normal. **B** - Representa o tecido hepático do grupo periodontite demonstrando vários hepatócitos com perda da conformação, apresentando esteatose e congestão sanguínea na veia central (VC). **C** - Tecido hepático do grupo hipercalórico + periodontite. Os hepatócitos exibem conformação em cordões alterada, congestão sanguínea (círculo) e presença de esteatose. A proporção de hepatócitos degenerados no grupo hipercalórico + periodontite apresentou-se superior ao observado no grupo periodontite. Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE). Aumento: 40x.

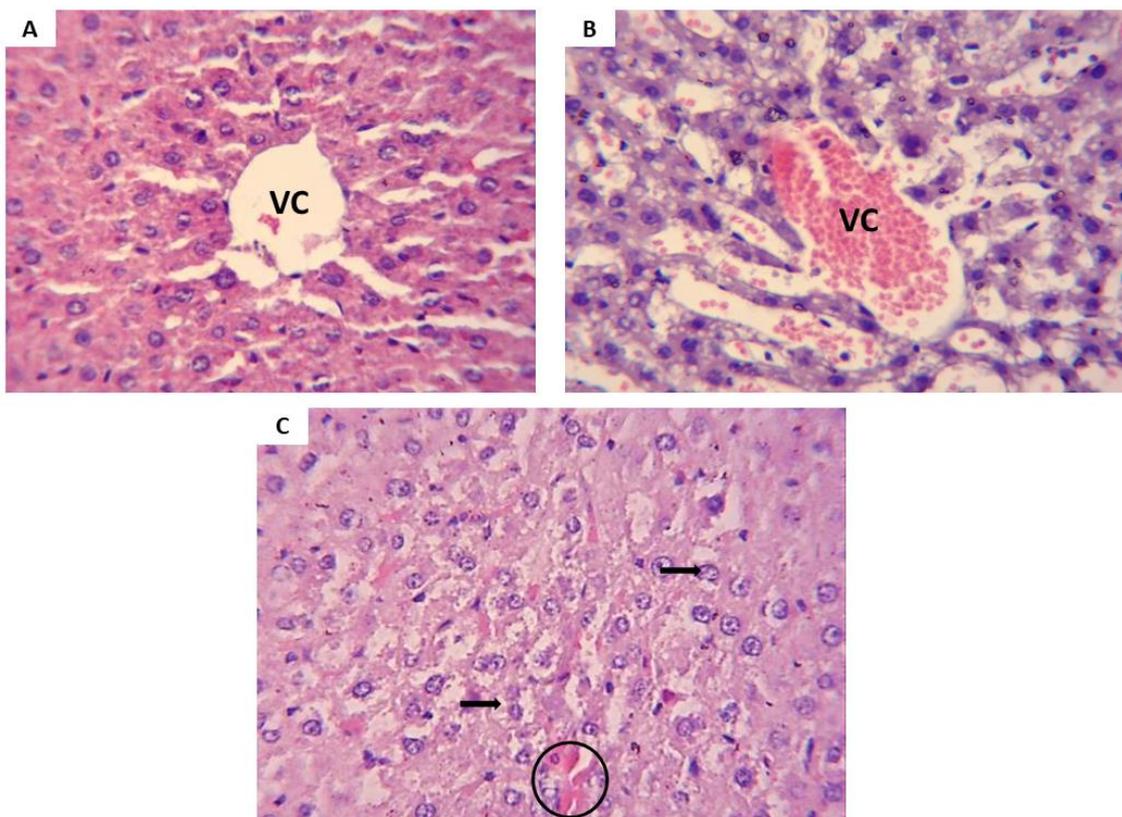


Tabela 2. Avaliação histopatológica em escores do fígado. Os valores representados são a moda, os valores mínimos e máximos.

	Controle Negativo	Periodontite	Hipercalórico + Periodontite
Escores de Esteatose	0 (0 - 1)	2 (1 - 3)*	3 (1 - 3) [#]
Escores de Inflamação	0 (0 - 1)	1 (0 - 1)	1 (0 - 2)
Escores de Necrose	0 (0 - 1)	1 (0 - 1)	1 (0 - 1)

* $p < 0.05$ indica comparação ao grupo controle e [#] $p < 0.05$ indica comparação ao grupo periodontite.

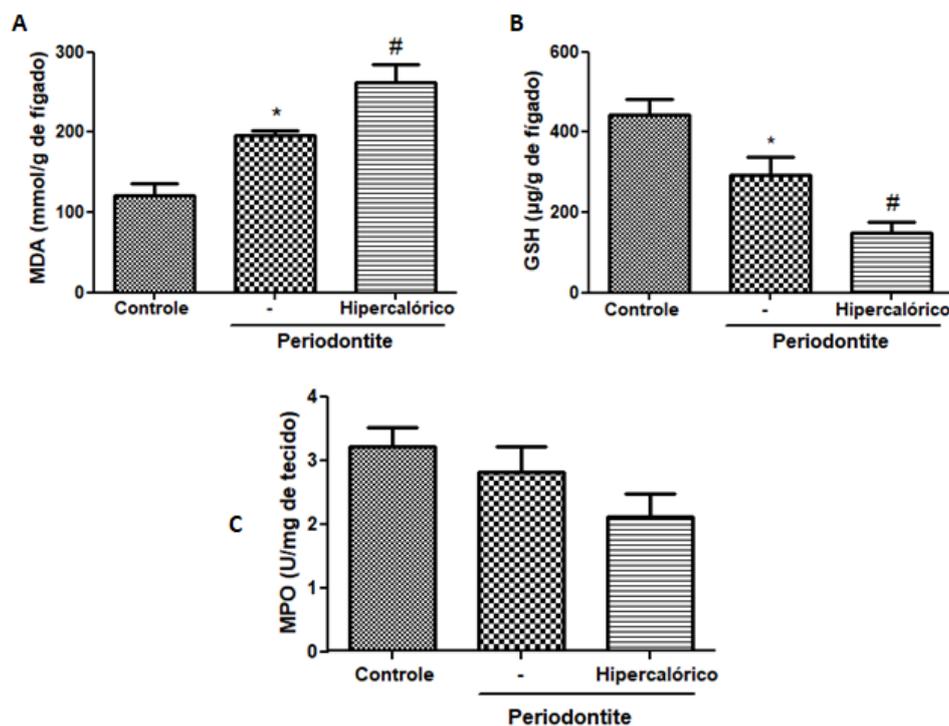
5.4 Níveis de MDA, GSH e MPO no fígado

Como mostrado na figura 7A, a peroxidação lipídica representada pelos níveis de MDA apresentou-se mais elevada no grupo hipercalórico + periodontite ($261,6 \pm 22,8$ mmol/g), quando comparada aos grupos controle ($121,3 \pm 14,9$ mmol/g) e periodontite ($195,5 \pm 6,4$ mmol/g), $p < 0,05$

Na figura 7B, o grupo hipercalórico + periodontite apresentou os menores níveis de GSH (grupo controle apresentou $444,0 \pm 37,4$ μ g / g, periodontite $294,0 \pm 43,5$ μ g / g e hipercalórico + periodontite $149,3 \pm 27,0$ μ g / g, $p < 0,05$).

Na figura 7C, os níveis de MPO não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (grupo controle $3,2 \pm 0,3$ U / mg de tecido, periodontite $2,8 \pm 0,4$ U / mg e hipercalórico + periodontite $2,1 \pm 0,4$ U / mg, $p > 0,05$).

Figura 7. Dosagens bioquímicas do fígado. **A** – Os níveis de **MDA** apresentaram-se aumentados no grupo Hipercalórico + Periodontite em relação aos demais grupos. **B** – Os níveis de **GSH** apresentaram-se estatisticamente diminuídos no grupo Hipercalórico + Periodontite quando comparado aos outros grupos. **C** – Os dados de **MPO** não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.



* $p < 0.05$ indica comparação ao grupo controle e # $p < 0.05$ indica comparação ao grupo periodontite.

5.5 Parâmetros de peso e níveis sanguíneos

O peso dos animais foi significativamente aumentado apenas no grupo hipercalórico + periodontite (Tabela 3). Entretanto, o peso do fígado não apresentou diferença estatística entre os grupos (Tabela 3).

Também na tabela 3, biomarcadores sanguíneos podem ser observados. A glicose não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos; o colesterol total apresentou-se maior no grupo hipercalórico + periodontite quando comparado aos demais; com o colesterol HDL aconteceu de maneira diferente, o grupo hipercalórico + periodontite apresentou uma diminuição significativa em seus níveis; e o ácido úrico foi aumentado em seis vezes no grupo hipercalórico + periodontite.

Um biomarcador hepático, ALT (Tabela 3), apresentou significativamente maior no grupo hipercalórico + periodontite quando comparado ao controle; no entanto, a AST não mostrou diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 3. Parâmetros de peso e marcadores sanguíneos.

Grupos	Controle	Periodontite	
		-	Hipercalórico
Parâmetros de peso			
Corpo(g)	207.1 ± 3.4	208.9 ± 3.9	228.2 ± 7.2 [†]
Fígado			
Absoluto (g)	7.1 ± 0.2	7.4 ± 0.2	6.9 ± 0.3
Marcadores sanguíneos			
Glicose	226.6 ± 14.8	232.9 ± 7.8	211.5 ± 15.9
Colesterol total	73.2 ± 4.4	85.4 ± 4.7*	109.5 ± 8.9 [†]
Colesterol HDL	24.7 ± 0.8	25.5 ± 1.0	15.2 ± 2.8 [†]
Ácido úrico	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.1	4.8 ± 1.7 [†]
Alanina	32.6 ± 2.6	47.0 ± 4.6	54.5 ± 5.8 [†]
Aminotransferase (ALT)			
Aspartato	51.7 ± 2.0	48.4 ± 9.9	42.8 ± 5.6
Aminotransferase (AST)			

* $p < 0.05$ indica comparação ao grupo controle e [†] $p < 0.05$ indica comparação ao grupo periodontite.

Em resumo, esses resultados demonstram que a dieta hipercalórica agrava parâmetros como: MDA, GSH, escore de esteatose, peso dos ratos, colesterol total e HDL, ácido úrico e ALT, quando comparado ao grupo periodontite, potencializando as alterações causadas por periodontite.

6. DISCUSSÃO

Este estudo procurou associar a ingestão de dietas ricas em gordura e açúcar com o agravamento da esteatose hepática causada pela doença periodontal, e, como resultado, obteve-se um aumento significativo em termos histológicos da doença. A literatura já vem relatando a associação entre a doença periodontal e alterações hepáticas, como, por exemplo, que pacientes portadores de esteatose hepática apresentam uma elevada presença de periodontopatógenos no periodonto em comparação a indivíduos sem alterações hepáticas (FURUTA et al., 2010). Os mecanismos dessa relação ainda estão sendo desvendados, entretanto se sugere o acesso dessas bactérias, citocinas e células inflamatórias a sítios distantes, como outros órgãos e, dentre eles, o fígado, através da circulação. No tecido hepático, esses fatores causam inflamação e potencializam o estresse oxidativo decorrente da própria doença periodontal, causando a peroxidação lipídica, a qual resulta em acúmulo de gordura nos hepatócitos (YONEDA et al., 2012).

Como observado por meio dos dados clínicos de ISG, PS, mobilidade dentária e AOA, o modelo de indução da periodontite permaneceu constante em ambos os grupos (Figuras 4A, 4B, 5D e 5E). Os resultados desses parâmetros, sem diferenças significativas entre os grupos com a doença, conferem portanto a eficácia ao modelo de indução de periodontite utilizado (RIVAS-TUMANYAN et al., 2013). A confirmação da instalação e desenvolvimento da doença através dos parâmetros acima citado permite a análise de suas repercussões sistêmicas.

Por sua vez, a biópsia hepática, por meio da avaliação histopatológica, ainda é o padrão ouro para o diagnóstico de esteatose e avaliação de sua progressão (SCHWIMMER et al., 2005; HARWOOD, 2010). A avaliação histológica matém-se como o único meio preciso para avaliar o grau de esteatose, lesões necroinflamatórias, lesões de fibrose e esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) e serve como principal meio de distinguir a EHNA de uma esteatose “simples” ou esteatose com inflamação (DE ANDRADE et al., 2018). Os resultados do presente estudo demonstraram agravamento no grau histopatológico de esteatose quando a dieta rica em gorduras é associada a periodontite (Tabela 2), havendo um aumento no número de hepatócitos com conteúdo lipídico em seu citoplasma, maior degeneração e desorganização dos cordões de hepatócitos e aumento na congestão sanguínea (Figura 6). No entanto, não foram

observadas diferenças significantes em termos de inflamação e necrose entre os grupos com periodontite (Tabela 2).

O estresse oxidativo ligado à esteatose causa alterações nos níveis de MDA e GSH no tecido hepático (VASCONCELOS et al., 2017). Os valores de MDA foram elevados nas amostras de fígado dos grupos com periodontite em relação ao grupo controle, entretanto a análise entre os grupos com periodontite mostrou que o grupo hipercalórico + periodontite teve um aumento estatisticamente significativo quando comparado ao grupo que não recebeu a dieta (Figura 7A). Assim, a dieta rica em gordura agrava o dano hepático devido à esteatose.

A GSH, encontrada principalmente nos hepatócitos, é um antioxidante intracelular que possui diversas funções, como a desintoxicação eletrofílica e a eliminação de oxidantes (LU, 2013). O estresse oxidativo observado na periodontite aumenta o dano hepático e diminui os níveis de GSH no fígado (CARVALHO et al., 2017). Isso explica os baixos níveis de GSH no fígado em ambos os grupos com periodontite. A comparação entre os grupos periodontite e hipercalórico + periodontite mostrou que a associação da dieta rica em gordura diminui significativamente os níveis de GSH no órgão (Figura 7B). Essa diferença nos níveis de MDA e GSH observados no grupo com periodontite + alto teor de gordura pode ser explicada pelo dano hepático potencializado e aumento do grau de esteatose hepática provocado pela dieta hipercalórica.

Devido ao intenso processo inflamatório presente na esteatose, há aumento da atividade da MPO no tecido hepático (RENSEN et al., 2009). A MPO é uma enzima presente nos neutrófilos, comumente utilizada como marcador indireto de infiltração neutrofílica nos processos inflamatórios. Em nosso estudo, apesar da identificação relevante da inflamação nas amostras de fígado, a atividade da MPO não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados. A ausência de diferenças entre os grupos em relação à inflamação (Tabela 2) pode explicar a similaridade dos dados da atividade da MPO no fígado (Figura 7C). Outra hipótese dessa ausência de diferença é que a esteatose não está relacionada apenas ao processo inflamatório, mas também ao metabolismo lipídico. Além disso, a microbiota intestinal tem sido implicada como uma causa emergente da esteatose, devido a sua influência nesse metabolismo específico (EVERARD et al., 2014; LAU et al., 2015).

O fígado é essencial na homeostase lipídica (SUCIU et al., 2015; WU et al., 2018). Com alterações hepáticas causadas pela periodontite, o metabolismo lipídico sofre

alterações, resultando em aumento dos níveis de colesterol total. Em nosso estudo, as concentrações de colesterol total do grupo hipercalórico + periodontite foram elevadas em comparação aos grupos controle e periodontite. Além disso, o colesterol HDL também apresentou valores significativamente menores apenas no grupo hipercalórico + periodontite, corroborando com outros estudos, nos quais a esteatose esteve freqüentemente relacionada aos seus baixos níveis (PACÍFICO et al, 2014; FADAEI et al, 2018; WANG et al, 2018). O HDL é considerado um bom tipo de colesterol e é diminuído considerando a dislipidemia presente nessa situação (DEEB et al., 2018). Em nosso estudo, a dieta hipercalórica associada à periodontite diminuiu os níveis de HDL, quando comparada ao grupo com periodontite (Tabela 3).

O ácido úrico é o produto final de oxidação do catabolismo das purinas, que é metabolizado no fígado, tecido adiposo e músculo. Vários fatores, incluindo a dieta rica em frutose e o uso de xenobióticos e álcool, contribuem para a hiperuricemia, componente da anormalidade metabólica e hemodinâmica denominada síndrome metabólica, caracterizada por obesidade abdominal, intolerância à glicose, resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão e esteatose (LIMA et al, 2015). Considerando a dislipidemia e a esteatose aumentadas em ratos com dieta hipercalórica em nosso estudo, os níveis de ácido úrico apresentaram-se significativamente maiores (Tabela 3), assim como na literatura. Estes dados podem ser úteis para prever o desenvolvimento de esteatose por meio de dosagens sanguíneas em pacientes com periodontite.

ALT e AST são marcadores de lesões hepáticas comumente necessárias no diagnóstico de esteatose (YAMAMOTO et al, 2010; YONEDA et al, 2012). Pacientes com esteatose apresentam altos níveis desses marcadores no sangue. Neste estudo, os níveis de ALT apresentados também aumentaram, o que significa que o dano hepático foi aumentado na presença de dieta hipercalórica (Tabela 3).

A dieta hipercalórica utilizada neste estudo demonstrou anteriormente que não foi suficiente para causar graus elevados de escore de esteatose (RODRIGUES et al., 2018), demonstrando que o aumento dos níveis nos diversos parâmetros avaliados foi agravado pela sua associação com a periodontite. Sabe-se que a ingestão total de altas calorias está associada à esteatose, e vários estudos têm se concentrado no papel de nutrientes específicos, como gorduras saturadas e carboidratos, no desenvolvimento e transição da doença (AUBERVAL et al., 2004; TOSHIMITSU et al., 2007; TETRI et al., 2008). Como observado em nosso estudo, a associação de periodontite com a dieta

rica em gordura e açúcar causou um aumento significativo no grau de esteatose hepática e outros parâmetros como MDA, GSH, escore de esteatose no fígado, peso dos ratos, total e Colesterol HDL, ácido úrico e ALT no soro dos ratos.

Por fim, nosso estudo demonstrou que a associação entre a dieta hipercalórica e a periodontite é negativa para a saúde hepática, destacando a atenção à clínica médica especialmente aos pacientes com morbidades associadas.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nesse estudo, pode-se sugerir que a dieta rica em gorduras e açúcares (hipercalórica) agravou a esteatose hepática ocasionada pela doença periodontal em ratos, por meio dos seguintes dados:

- Indução da periodontite por meio da inserção de uma ligadura nos primeiros molares inferiores das ratas;
- Observação do agravamento de parâmetros clínico-inflamatórios (Índice de Sangramento Gengival, Profundidade de Sondagem e Mobilidade) na cavidade oral dos animais que receberam indução de periodontite;
- Os danos hepáticos observados histologicamente e classificados em escores apresentaram-se maiores quando ocorreu a associação da dieta com a periodontite.
- Aumento dos níveis de MDA (marcador de estresse oxidativo) na presença da dieta associada à periodontite, enquanto os níveis de GSH (antioxidante natural) se mostraram diminuídos. Ambos marcadores bioquímicos.
- Aumento dos níveis séricos de marcadores de dano hepático, como ALT, colesterol total e ácido úrico e diminuição do colesterol bom (HDL).

REFERÊNCIAS

ACCARINI, R.; GODOY, M.F. Doença Periodontal como Potencial Fator de Risco para Síndromes Coronarianas Agudas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, 2006.

AINAMO, J.; TALARI, A. The increase with age of the width off attached gingiva. **Journal of Periodontology**, v.29, 1976.

AKINKUGBE, A.A. et al. Periodontitis and Non-alcoholic Fatty Liver Disease, a population based cohort investigation in the Study of Health in Pomerania. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, n. 11, 2017.

ALDABA-MURUATO, L. R. et al. Protective effects of allupurinol against acute liver damage and cirrhosis induced by carbon tetrachloride: modulation NF-KB, cytokine production and oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1820, n. 2, p. 65- 75, 2012.

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

ALMEIDA, R.F. et al. Associação entre doença periodontal e doenças sistêmicas. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 22, 2006.

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

AMABIS, J.M.; MARTHO, G.R. Biologia dos organismos 2: 2. ed. Editora Moderna, 2004.

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

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

AUBERVAL, N. et al. Metabolic and oxidative stress markers in Wistar rats after 2 months on a high-fat diet. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v.6, p. 130, 2004. doi:10.1186/1758-5996-6-130.

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

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

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

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

CAI, X. et al. Protective effects of baicalin on ligature-induced periodontitis in rats. **Journal of Periodontal Research**, v.43, p.14-21, 2008. doi: 10.1111/j.1600-0765.2007.00989.x.

CAMERON, A.J. et al. The metabolic syndrome in Australia: prevalence using four definitions. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.77, n.3, p. 471-478, 2007.

CANDEO, L.C. Effects of periodontitis in the development of asthma: The role of photodynamic therapy. **PLoS One**, v.12, n.11, 2017.

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

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

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

DE ANDRADE, R.S.B.; RODRIGUES, A.A.; FRANÇA, L.F.C.; VASCONCELOS, D.F.P. Histopathological evaluation of non-alcoholic fatty liver disease: mini-review of literature. **Journal of Gastroenterology and Hepatology Research**, v.7, n.1, 2018.

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

DEEB, A.; ATTIA, S.; MAHMOUD, S.; ELHAJ, G.; ELFATIH, A. Dyslipidemia and fatty liver disease in overweight and obese children. **Journal of Obesity**, 2018.

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

DUARTE, M.A.S.M.; DA SILVA, G.A.P. Esteatose hepática em crianças e adolescentes obesos. **Journal of Pediatrics**, v. 87, n.2, 2011.

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

EVERARD, A. et al. *Saccharomyces boulardii* administration changes gut microbiota and reduces hepatic steatosis, low-grade inflammation, and fat mass in obese and type 2 diabetic db/db mice. **mBio**, v.5, n.3, p.01011-01014, 2014.

FADAEI, R. et al. Impaired HDL cholesterol efflux capacity in patients with non-alcoholic fatty liver disease is associated with subclinical atherosclerosis. **Science Reports**, v.8, n.1, 2018.

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

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

FURUTA, M. EKUNI, D.; YAMAMOTO, T. et al. Relationship between periodontitis and hepatic abnormalities in young adults. **Acta Odontologica Scandinavica**, n. 68, 2010.

GARIB, D.G. et al. Morfologia alveolar sob a perspectiva da tomografia computadorizada: definindo os limites biológicos para a movimentação dentária. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v. 15, n. 5, 2010.

GHAFFARI, H.; GHASSAM, B. J.; PRAKASH, H. S. Hepatoprotective and cytoprotective properties of *Hyptissuaveolens* against oxidative stress-induced damage by CCl₄ and H₂O₂. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Philadelphia, v. 5, n. 11, p. 868 – 874, 2012.

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

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

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

HARWOOD, J. et al. Safety of blind percutaneous liver biopsy in obese children: a retrospective analysis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 44, p.e253-e255, 2010.

IRIE, K. et al. Is there an occupational status gradient in the development of periodontal disease in Japanese workers? A 5-year prospective cohort study. **Journal of Epidemiology**, n. 27, 2017.

- ISHIKAWA, G. et al. Microradiographic study of cementum and alveolar bone. **Journal of Dental Research**, v.43, 1964.
- KRAWCZYK, M.; BONFRATE, L.; PORTINCASA, P. Nonalcoholic fatty liver disease. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, n. 5, p. 695-708, 2010.
- LAU, E.; CARVALHO, D.; FREITAS, P. Gut microbiota: association with NAFLD and metabolic disturbances. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- LIMA, H.G.; LARA, V.S. Aspectos Imunológicos da Doença Periodontal Inflamatória: Participação dos Mastócitos. **Revista UNOPAR Científica de Ciências Biológicas e da Saúde**, v.15, n.3, 2013.
- LIMA, W.G.; MARTINS-SANTOS, M.E.S.; CHAVES, V.E. Uric acid as a modulator of glucose and lipid metabolism. **Biochimie**, v.116, p.17-23, 2015.
- LIU, R. et al. Effects of systemic ornidazole, systemic and local compound ornidazole and pefloxacin mesylate on experimental periodontitis in rats. **Medical Science Monitor**, v. 18, 2012.
- LONGATO L. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a tale of fat and sugar? **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 18, n. 6, p. 14, 2013.
- LU, S.C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830, n.1, 2013.
- MA, X. et al. Expression of glutathione S-transferase A1, a phase II drug-metabolizing enzyme in acute hepatic injury on mice. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 14, 2017.
- MACEDO, F.R. et al. Associação entre periodontite e doença pulmonar. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 58, n. 1, 2010.
- MAGGIONI, L. S. A lipoperoxidação plasmática como preditor de esteatohepatite não alcoólica em obesos mórbidos com doença hepática gordurosa não alcoólica. 2014. Tese (Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde) - Universidade Católica.
- MARTELLI, A. Metabolismo Hepatocelular dos Lipídeos: uma Abordagem Clínica e Histopatológica do Acúmulo Intracelular de Lípidos (Esteatose) do Parênquima Hepático Induzida pelo Álcool. **Journal of Health Sciences**, v. 12, n. 1, 2015.
- MCCULLOCH, C.A.; LEKIC, P.; MCKEE, M.D. Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament. **Periodontology 2000**, v. 24, 2000.
- MILIC, S.; STIMAC, D. Nonalcoholic fatty liver disease/steatohepatitis: Epidemiology, pathogenesis, clinical presentation and treatment. **Digestive Diseases**, n. 30, 2012.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Patologia, processos gerais: 4.ed. Atheneu, 2004.

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

MOTTA, V.T. Bioquímica: 2.ed. Caxias do Sul, RS: EDUCS, 2005.

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

NEWMAN, M.G.; TAKEI, H.H.; KLOKKEVOLD, P.R. Carranza, periodontia clínica. 10 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

OLIVEIRA, G.S. Importância da gengiva ceratinizada na saúde periodontal e periimplantar. 2001 (Especialização em Periodontia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

OLIVEIRA, J.S. et al. Biological Effects of Medicinal Plants on Induced Periodontitis: a systematic review. **International Journal of Dentistry**, 2016.

PACÍFICO, L. et al. Association of serum triglyceride-to-HDL cholesterol ratio with carotid artery intima-media thickness, insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.24, n.7, 2014.

PALEKAR, N.A. et al. Clinical model for distinguishing nonalcoholic steatohepatitis from simple steatosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Liver International**, v. 26, n. 2, 2006.

PAPANDREOU, D; ROUSSO, I.; MAVROMICHALIS, I. Update on non-alcoholic fatty liver disease in children. **Clinical Nutrition**, v. 26, n.4, 2007.

PERSSON, G.R. Dental geriatrics and periodontitis. **Periodontology 2000**, n. 74, v. 1, 2017.

PESSOA, L.S. et al. One or two ligatures inducing periodontitis are sufficient to cause fatty liver. **Medicina Oral Patologia Oral Cirurgia Bucal**, v.23, n.3, p. e269-e276, 2018.

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

RENSEN, S.S. et al. Increased hepatic myeloperoxidase activity in obese subjects with nonalcoholic steatohepatitis. **American Journal of Pathology**, v.175, p.1473-1482, 2009.

RIVAS-TUMANYAN, S. et al. Periodontal disease, hypertension, and blood pressure among older adults in Puerto Rico. **Journal of Periodontology**, n. 64, 2013.

RODRIGUES, A.A. et al. High-fat rat model useful to evaluate the aggravation of liver damage associated with comorbidities. **Nutrition**. 2018 [Under review].

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

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

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

SCHWIMMER, J.B.; BEHLING, C.; NEWBURY R. Histopathology of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 42, p.641-649, 2005.

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

SHINGAI, R.K.; RAI, B. sTNF-R Levels: Apical Periodontitis Linked to Coronary Heart Disease. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v.15, n. 5, 2017.

SHOELSON, S.E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, n. 132, 2007.

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

SIMPSON, H.E. The degeneration of the rest of Malassez with age as observed by the apoxestic technique. **Journal of Periodontology**, v. 36, 1965.

SOHEILIFAR, S. et al. Comparison of Periodontal Ligament Stem Cells Isolated from the Periodontium of Healthy Teeth and Periodontitis-Affected Teeth. **Journal of Dentistry of Tehran**, v. 13, n. 4, 2016.

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

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

SUCIU, M. et al. Acetaminophen-induced liver injury: implications for temporal homeostasis of lipid metabolism and eicosanoid signaling pathway. **Chemical-Biological Interactions**, v.242, p.335-344, 2015.

TERPENNING, M.S. et al. Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. **Journal of American Geriatric Society**, v. 49, n.5, 2001.

TETRI, L.H. et al. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalente. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 295, p. G987-G995, 2008.

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

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

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

TOSHIMITSU, K. et al. Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis. **Nutrição**, v.23, p.46-52, 2007.

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

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

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

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

WANG, H.L. et al. Periodontal regeneration. **Journal of Periodontology**, v.76, n.9, p.1601-1622, 2005.

WANG, K.; SHAN, S.; ZHENG, H.; ZHAO, X.; CHEN, C.; LIU, C. Non-HDL-cholesterol to HDL-cholesterol ratio is a better predictor of new-onset non-alcoholic fatty liver disease than non-HDL-cholesterol: a cohort study. **Lipids in Health and Disease**, v.17, n.1, 2018.

WU, Z. et al. Induction of liver steatosis in bap31-deficient mice burdened with tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n.8, 2018.

XU, Y.; WEI, W. A comparative study of systemic subantimicrobial and topical treatment of minocycline in experimental periodontitis of rats. **Archives of Oral Biology**, v. 51, 2006.

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

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

YOUNOSSI, Z.M. et al. A genomic and proteomic study of the spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 42, n. 3, 2005.

ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



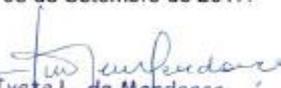
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceespi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

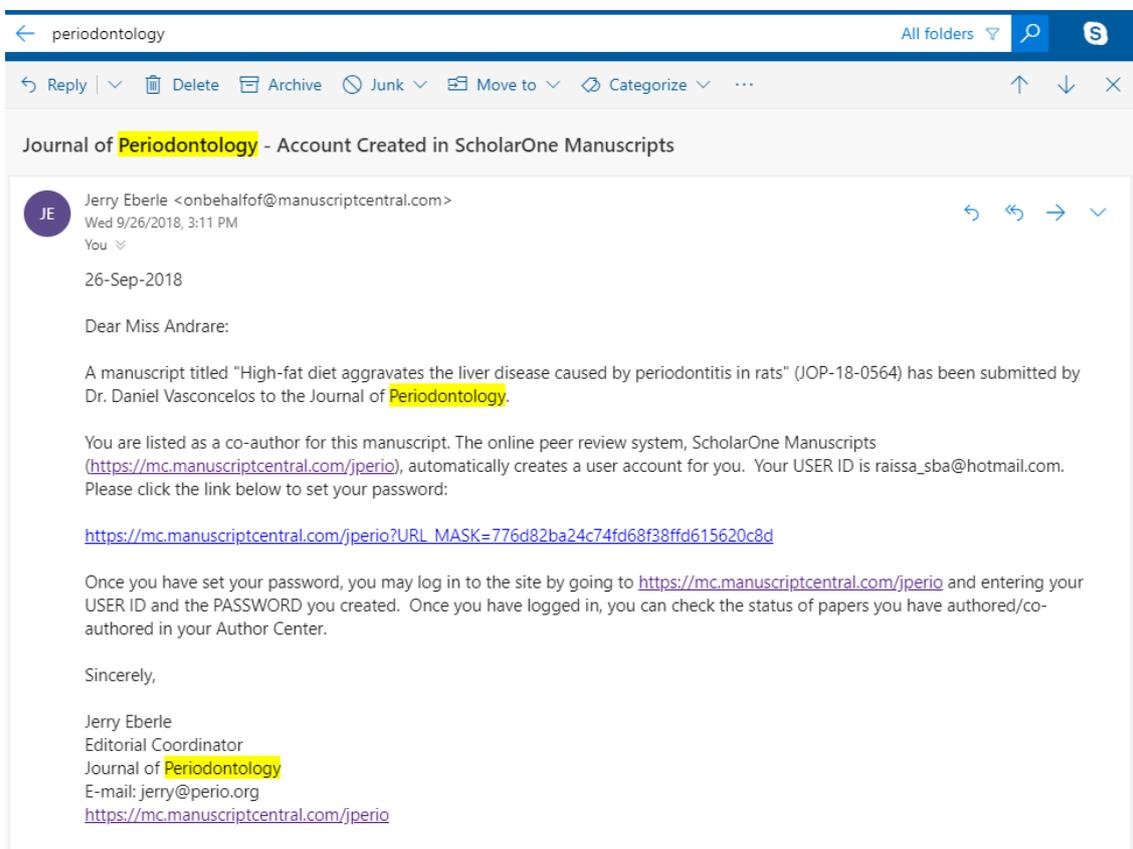
Certificamos que a proposta intitulada "*Avaliação dos efeitos de diferentes tratamentos para esteatose causada pela periodontite induzida em animais*", registrada nº 385/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. DANIEL FERNANDO PEREIRA VASCONCELOS do Departamento de Biomedicina, Campus Ministro Reis Veloso/UFPI 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**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Janeiro/2018 à Janeiro/ 2022
Espécie/Linhagem/raça	Rato isogênico/ wistar
Nº de Animais	70
Peso/ Idade	200g/ 12 sem.
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFPI.

Teresina, 08 de Setembro de 2017.


 Prof.^a Ivet L. de Mendonça
 Comissão de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora

ANEXO II – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO AO *JOURNAL OF PERIODONTOLOGY*



The screenshot shows an email interface for the 'periodontology' folder. The email is from Jerry Eberle (JE) at manuscriptcentral.com, dated Wednesday, September 26, 2018, at 3:11 PM. The subject is 'Journal of Periodontology - Account Created in ScholarOne Manuscripts'. The body of the email informs Miss Andrare that a manuscript titled 'High-fat diet aggravates the liver disease caused by periodontitis in rats' (JOP-18-0564) has been submitted to the Journal of Periodontology. It also states that she is listed as a co-author and that an account has been created for her in the ScholarOne Manuscripts system. A link is provided to set her password, and instructions are given on how to log in and check the status of her papers.

periodontology All folders

Reply | Delete | Archive | Junk | Move to | Categorize

Journal of **Periodontology** - Account Created in ScholarOne Manuscripts

JE Jerry Eberle <onbehalf@manuscriptcentral.com>
Wed 9/26/2018, 3:11 PM
You

26-Sep-2018

Dear Miss Andrare:

A manuscript titled "High-fat diet aggravates the liver disease caused by periodontitis in rats" (JOP-18-0564) has been submitted by Dr. Daniel Vasconcelos to the Journal of **Periodontology**.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer review system, ScholarOne Manuscripts (<https://mc.manuscriptcentral.com/jperio>), automatically creates a user account for you. Your USER ID is raissa_sba@hotmail.com. Please click the link below to set your password:

https://mc.manuscriptcentral.com/jperio?URL_MASK=776d82ba24c74fd68f38ffd615620c8d

Once you have set your password, you may log in to the site by going to <https://mc.manuscriptcentral.com/jperio> and entering your USER ID and the PASSWORD you created. Once you have logged in, you can check the status of papers you have authored/co-authored in your Author Center.

Sincerely,

Jerry Eberle
Editorial Coordinator
Journal of **Periodontology**
E-mail: jerry@perio.org
<https://mc.manuscriptcentral.com/jperio>