

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

GABRIELA VELOSO VIEIRA DA SILVA PINHEIRO

ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE TECIDO ÓSSEO ALVEOLAR E DO LIGAMENTO PERIODONTAL EM RATOS APÓS INDUÇÃO DE SEPSE

PONTA GROSSA

2018

GABRIELA VELOSO VIEIRA DA SILVA PINHEIRO

ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE TECIDO ÓSSEO ALVEOLAR E DO LIGAMENTO PERIODONTAL EM RATOS APÓS INDUÇÃO DE SEPSE

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marcela Claudino da Silva Nardino

PONTA GROSSA

2018

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

P654 Pinheiro, Gabriela Veloso Vieira da Silva
Análise histológica e imunohistoquímica
de tecido ósseo alveolar e do ligamento
periodontal em ratos após indução de
sepse/ Gabriela Veloso Vieira da Silva
Pinheiro. Ponta Grossa, 2018.
60f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da
Saúde - Área de Concentração: Atenção
Interdisciplinar em Saúde), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marcela Claudino
da Silva Nardino.

1.Sepse. 2.Doenças sistêmicas.
3.Metabolismo ósseo. 4.Periodonto.
I.Nardino, Marcela Claudino da Silva. II.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Mestrado em Ciências da Saúde. III. T.

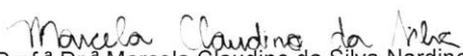
CDD: 616.311

GABRIELA VELOSO VIEIRA DA SILVA PINHEIRO

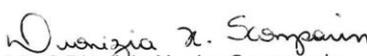
ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DE TECIDO ÓSSEO
ALVÉOLAR E DO LIGAMENTO PERIODONTAL EM RATOS APÓS INDUÇÃO DE
SEPSE

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre pela Universidade Estadual de Ponta Grossa, Mestrado em Ciências da Saúde, área de concentração em Atenção Interdisciplinar em Saúde.

Ponta Grossa, 28 de maio de 2018.


Prof.^a Dr.^a Marcela Claudino da Silva Nardino - Orientadora
Doutora em Biologia Oral
Universidade Estadual de Ponta Grossa


Prof.^a Dr.^a Melissa Rodrigues de Araujo
Doutora em Estomatologia
Universidade Federal do Paraná


Prof.^a Dr.^a Dionizia Xavier Scomparin
Doutora em Biologia Celular
Universidade Estadual de Ponta Grossa

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por estar sempre presente na minha vida, guiar meu destino e me conceder saúde para a realização deste sonho.

Agradeço, imensamente, aos meus pais, Sueli e Jorge, por todo sacrifício que sempre fizeram para investir em minha educação e por nunca medirem esforços para me darem o melhor. Por sempre acreditarem no meu sucesso, me darem apoio incondicional em tudo e serem meus exemplos de caráter, honestidade e bondade na vida.

Agradeço ao meu marido, Caio, por todo suporte durante este período, por entender minha ausência em alguns momentos e por também me incentivar a ser melhor a cada dia e seguir sempre em frente da maneira correta.

Agradeço a minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Marcela Claudino da Silva Nardino, por todos os ensinamentos, pela compreensão em todos os momentos do mestrado e pela sua dedicação e ética em seu trabalho.

Agradeço à equipe do Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva (UFU) e à Prof.^a Dr.^a Melissa Rodrigues de Araujo (UFPR) pelo auxílio na parte experimental deste estudo.

Agradeço fortemente a minha amiga Laura que durante todo este tempo esteve sempre disponível para me ajudar, me ensinar, me ouvir e me incentivar. Agradeço também à Mariane e Jeanine, que permitiram generosamente as diversas mudanças no meu horário neste período e torceram por mim.

Agradeço à Fundação Araucária pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, agradeço a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

PINHEIRO, GVVS. **Análise histológica e imunohistoquímica de tecido ósseo alveolar e do ligamento periodontal em ratos após indução de sepse.** Ponta Grossa, 2018, 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

Introdução: Estudos epidemiológicos têm apontado a doença periodontal como a desordem óssea mais prevalente em humanos. Sua etiologia é definida de forma multifatorial, em que há influência de doenças sistêmicas. De fato, muitos estudos relatam esta última associação e, neste contexto, a sepse é uma doença sistêmica caracterizada por uma disfunção orgânica com risco de vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à uma infecção. O objetivo deste estudo foi avaliar por meio de análise histológica e imunohistoquímica se a sepse é capaz de exercer influência sobre o metabolismo ósseo na região do periodonto. **Métodos:** Foram utilizados dois grupos de ratos *Wistar* divididos em controle (n=6) e sepse (n=6). Os animais passaram pelo modelo de procedimento de ligação e perfuração do ceco (CLP) e, após 24 horas, por meio de sobredose anestésica, suas hemimandíbulas foram coletadas e submetidas a procedimentos histotécnicos. Em seguida, componentes do periodonto como matriz óssea, fibras colágenas, fibroblastos, osteócitos, células inflamatórias, vasos sanguíneos e espaços em branco do ligamento periodontal, osso alveolar e osso da área da furca foram avaliados e quantificados por meio de análise histomorfométrica. Posteriormente, foram realizadas análises por imunohistoquímica nestas mesmas regiões, visando avaliar o número de células imunomarcadas para BMP-2/4, osteocalcina e RANKL. **Resultados:** A análise histomorfométrica não revelou diferenças significativas entre os grupos avaliados. Entretanto, a análise imunohistoquímica revelou diferenças significativas no número de células imunomarcadas entre o grupo controle e sepse para osteocalcina e RANKL. **Conclusões:** Foram observadas algumas modificações no periodonto de ratos após 24 horas da indução da sepse. Contudo, outros estudos são necessários para possibilitar uma avaliação mais abrangente sobre os possíveis efeitos da sepse na região periodontal, incluindo avaliações moleculares e com períodos experimentais maiores.

Palavras-chave: sepse, doenças sistêmicas, metabolismo ósseo, periodonto.

ABSTRACT

PINHEIRO, GVVS. **Análise histológica e imunohistoquímica de tecido ósseo alveolar e do ligamento periodontal em ratos após indução de sepse.** Ponta Grossa, 2018, 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

Introduction: Epidemiological studies have pointed the periodontal disease as the most prevalent bone disorder in humans. Its aetiology is defined in a multifactorial way, in which there is influence of systemic illnesses. In fact, many studies report this association and, in such context, sepsis is a systemic disease characterized by an organic malfunction that is life threatening, caused by a deregulated response from the host to certain infection. The objective of this study was to evaluate through histological and immunohistochemical analyses whether sepsis is able to have influence on the bone metabolism in the periodontal regions. **Methods:** Two groups of Wistar rats were used, which were divided into control (n=6) and sepsis (n=6). The animals were submitted to the model of procedure cecum link and perforation (CLP) and, after 24 hours, through an anaesthetic overdose, their hemimandibles were collected and submitted to histotechnical procedures. Next, periodontal components such as bone matrix, collagenous fibers, fibroblasts, osteocytes, inflammatory cells, blood vessels, periodontal ligament blank spaces, alveolar bone and bone from the furcation area were evaluated and quantified using the histomorphometric analysis. Later on, immunohistochemical analysis was carried out in the same regions, aiming at evaluating the number of BMP-2/4, osteocalcin and RANKL immunolabeled cells. **Results:** The histomorphometric analysis did not reveal significant differences between the groups under analysis. However, immunohistochemical analysis revealed significant differences in the number of immunolabelled cells between the control and sepsis groups for osteocalcin and RANKL. **Conclusions:** Some modifications were observed in the periodontium of rats after 24 hours of induction of sepsis. However, further studies are required to enable a broader evaluation of the possible effects of the sepsis on the periodontal region, including molecular evaluations and with longer experimental periods.

Keywords: sepsis, systemic diseases, bone metabolism, periodontium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Esquema de indução da sepse dos animais e coletas do material de interesse.....	25
QUADRO 1 - Regiões das hemimandíbulas e suas características avaliadas.....	26
FIGURA 2 - Distribuição dos campos para análise de morfometria do ligamento periodontal.....	27
FIGURA 3 - Distribuição dos campos para análise de morfometria do osso alveolar (A) e do osso da furca (B).	27
FIGURA 4 - Software ImageJ para identificação e contagem das estruturas de interesse na região do ligamento periodontal para animal do grupo controle.	28
FIGURA 5 - Esquema básico da imunomarcação pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase.	29
FIGURA 6 - Software ImageJ para contagem das imunomarcações na região do ligamento periodontal..	31
FIGURA 7 - Fotomicrografia representativa do primeiro molar de hemimandíbulas de ratos do grupo controle.	33
FIGURA 8 - Fotomicrografia representativa do primeiro molar de hemimandíbulas de ratos do grupo sepse.....	34
GRÁFICO 1 - Densidade de volume das fibras colágenas e fibroblastos da região do ligamento periodontal nos grupos controle e sepse.	35
GRÁFICO 2 - Densidade de volume dos vasos sanguíneos e das células inflamatórias da região do ligamento periodontal nos grupos controle e sepse.	35
GRÁFICO 3 - Densidade de volume dos espaços em branco da região do ligamento periodontal nos grupos controle e sepse.....	36
GRÁFICO 4 - Densidade de volume da matriz óssea da região do osso alveolar e de osso da área de furca nos grupos controle e sepse.....	37
GRÁFICO 5 - Densidade de volume dos osteócitos da região do osso alveolar e de osso da área de furca nos grupos controle e sepse.....	37
GRÁFICO 6 - Densidade de volume dos vasos sanguíneos da região do osso alveolar e de osso da área de furca nos grupos controle e sepse.....	38
GRÁFICO 7 - Densidade de volume das células inflamatórias da região do osso alveolar e de osso da área de furca nos grupos controle e sepse.	38
GRÁFICO 8 - Imunomarcação para BMP-2/4 nas regiões do ligamento periodontal, osso alveolar e osso da furca dos grupos controle e sepse.....	39

GRÁFICO 9 - Imunomarcção para RANKL nas regiões do ligamento periodontal, osso alveolar e osso da furca dos grupos controle e sepse.....	40
GRÁFICO 10 - Imunomarcção para osteocalcina na região do ligamento periodontal dos grupos controle e sepse.	41

LISTA DE SIGLAS

BMP	Proteínas ósseas morfogenéticas
BMP-2/4	Proteína óssea morfogenética do tipo 2/4
BSP	Sialoproteínas
CASP	<i>Colon ascendens stent peritonitis</i>
CBFA1	Fator de diferenciação de osteoblastos
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
CLP	<i>Cecal ligation and puncture</i>
DAB	Diaminobenzidina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
HE	Hematoxilina de Harris e Eosina de Lison
IFN- γ	Intérferon gama
IL-1	Interleucina-1
IL-1 α	Interleucina-1 α
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
LPS	Lipopolissacarídeos
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MMPs	Metaloproteinases da matriz
NO	Óxido nítrico
OC	Osteocalcina
ONC	Osteonectina
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
PBS	Solução tampão salina
PCI	<i>Persistent critical illness</i>
PTH	Paratormônio
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B
Runx2	<i>Runt-related transcription factor</i>
SIRS	Síndrome de resposta inflamatória sistêmica
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento β

TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
UTIs	Unidades de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
--------------------	----

2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 METABOLISMO ÓSSEO	15
3.2 DOENÇAS PERIODONTAIS	17
3.3 SEPSE.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 SUBMISSÃO À COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) EM PESQUISA.....	24
4.2 MODELO EXPERIMENTAL CLP (CECAL LIGATION AND PUNCTURE) DE INDUÇÃO DE SEPSE	24
4.3 PROCEDIMENTOS HISTOTÉCNICOS.....	25
4.3.1 Análise histomorfométrica	26
4.4 PROCEDIMENTOS IMUNOHISTOQUÍMICOS	29
4.4.1 Captura das imagens e avaliação imunohistoquímica	30
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	322
5 RESULTADOS.....	333
5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA	333
5.1.1 Ligamento periodontal.....	344
5.1.2 Osso alveolar e osso da área de furca.....	366
5.2 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	39
5.2.1 Marcação imunohistoquímica para BMP-2/4.....	39
5.2.2 Marcação imunohistoquímica para RANKL.....	400
5.2.3 Marcação imunohistoquímica para osteocalcina.....	411
6 DISCUSSÃO	433
7 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48

ANEXO 1 – Certificado da Comissão de Ética na Utilização de Animais da.....	57
Universidade Federal de Uberlândia	
ANEXO 2 - Certificado da Comissão de Ética na Utilização de Animais da	
Universidade Estadual de Ponta Grossa.....	59

1 INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos têm apontado a doença periodontal como a enfermidade óssea mais prevalente em humanos, sendo a principal causa da perda de dentes em adultos. Os principais fatores de risco envolvidos na etiologia da doença periodontal são o biofilme bacteriano, idade, uso de tabaco, diabetes mellitus, AIDS e a expressão alterada de produtos do hospedeiro como os mediadores inflamatórios (BORRELL; PAPPANOU, 2005; PAGE et al., 1997).

As doenças periodontais são caracterizadas por um processo inflamatório decorrente da presença de bactérias organizadas sob a forma de biofilme dentário (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005) e também pela destruição dos tecidos periodontais e reabsorção óssea alveolar (BORRELL; PAPPANOU, 2005; HEITZ-MAYFIELD, 2005). Somente nos Estados Unidos da América (EUA), o custo anual para a terapia periodontal gira em torno de 14 bilhões de dólares, o que demonstra a complexidade enfrentada no tratamento dos pacientes (HAJISHENGALLIS, 2010; ALBUQUERQUE et al., 2014). No Brasil, a prevalência da periodontite já foi detectada em algumas populações em números maiores que 90%, verificando-se maior tendência dos casos em indivíduos de classe social mais baixa (OPPERMANN, 2007).

Apesar de sua etiologia já ser bem estabelecida, esta condição vem sendo correlacionada com doenças sistêmicas como diabetes (CLAUDINO et al., 2007), artrite reumatoide (LUNDBERG et al., 2010; AL-KATMA et al., 2007), doença inflamatória do intestino (LIRA-JUNIOR; FIGUEREDO, 2016; VAVRICKA et al., 2013) e doenças cardiovasculares (LI et al., 2014; HERZBERG; MEYER, 1996).

Estudos mostram que esta influência parece ser decorrente da presença dos microrganismos e das citocinas liberadas em resposta a estes patógenos, as quais são capazes de atingir sítios distantes do ponto de infecção original (BRADAN et al., 2015). De fato, muitos estudos relatam a associação entre a doença periodontal e as doenças sistêmicas, envolvendo fatores relacionados ao estresse oxidativo e ao processo inflamatório (NEMEC et al., 2013; CLAUDINO et al., 2012; FIGUERO et al., 2014; NAKAJIMA et al., 2015).

Neste contexto, a sepse é uma alteração sistêmica caracterizada por uma disfunção orgânica com risco de vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à uma infecção (SHANKAR-HARI et al., 2016). Seus índices de

mortalidade estão diretamente relacionados ao número de órgãos que falham no organismo (DELLINGER et al., 2013), aos componentes das vias inflamatórias e imunológicas, à coagulação intravascular disseminada e às alterações no metabolismo energético (STEARNS-KUROSAWA et al., 2011). Esta síndrome também está correlacionada com uma série de doenças e comorbidades como diabetes, insuficiência cardíaca congestiva, cirrose, câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (KUMAR et al., 2011), entre outras que podem comprometer a qualidade de vida e prejudicar a recuperação dos pacientes (ERBS et al., 2017).

A sepse se tornou um problema global de saúde pública, uma vez que é a principal causa de morte em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) em todo o mundo (JUNIOR, LCMC; SILVA, RR, 2014) e, no Brasil, ocupa 25% dos leitos de hospitais (ILAS, 2016). Além disso, sabe-se que os pacientes internados em UTIs correm grandes riscos de desenvolverem doença óssea (NIERMAN; MECHANICK, 1998; KOCH et al., 2017).

Assim sendo, de forma geral, apesar de parecer haver uma inter-relação entre algumas doenças e sepse, em que o acometimento pela síndrome pode acelerar o surgimento de doenças crônicas (YENDE; IWASHYNA; ANGUS, 2014), a maioria dos estudos se concentra nas correlações da sepse com sistemas vitais (KENZAKA et al., 2012; LAUPLAND; NIVEN, 2017; FAIRCHILD et al., 2017), enquanto poucos estudos avaliam se, assim como outras doenças sistêmicas, a sepse é capaz de exercer influência sobre o metabolismo ósseo, mais especificamente, o periodonto.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a possível influência da sepse no ligamento periodontal e no tecido ósseo do processo alveolar e da área de furca por meio de análise histológica e imunohistoquímica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença e a intensidade do processo inflamatório na crista óssea alveolar de ratos por meio de análise histológica morfológica e morfométrica;
- Avaliar a presença e a intensidade do processo inflamatório no tecido ósseo da área de furca do primeiro molar de ratos por meio de análise histológica morfológica e morfométrica;
- Avaliar a presença e a intensidade do processo inflamatório no ligamento periodontal de ratos por meio de análise histológica morfológica e morfométrica;
- Avaliar o número de células imunomarcadas para o ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B (RANKL), proteína óssea morfogenética-2/4 (BMP-2/4) e osteocalcina (OC) por meio de reações de imunohistoquímica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 METABOLISMO ÓSSEO

O tecido ósseo é constituído por componentes orgânicos e inorgânicos, sendo caracterizado por ser um tecido dinâmico que se apresenta em constante processo de remodelação, no qual diferentes tipos celulares estão envolvidos como osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (VIEIRA, 1999). Desta maneira, a massa óssea é reflexo do equilíbrio entre a deposição e a reabsorção tecidual (CAO et al., 2005). Esta atividade é contínua e necessária para manter a integridade estrutural do esqueleto e também para que as funções metabólicas de deposição de cálcio e fósforo sejam mantidas (MCPHERSON; PINCUS, 2012).

Tanto tecido ósseo cortical, quanto tecido ósseo trabecular são constituídos principalmente de minerais inorgânicos, como cálcio e fósforo, e de matriz orgânica. Esta matriz em sua quase totalidade é formada por colágeno de tipo I e, em minoria, por proteínas não colágenas como osteocalcina (OC), osteopontina (OPN), osteonectina (ONC) e sialoproteínas (BSP) (MCPHERSON; PINCUS, 2012).

Estas proteínas possuem propriedades específicas na mineralização óssea (KIERSZENBAUM, 2008). Destas, a OC é a mais abundante na matriz extracelular óssea, sintetizada por osteoblastos (DUCY et al., 1996), com alta afinidade de ligação aos cristais de hidroxiapatita, regulando a maturação mineral (HAUSCHKA; WIANS, 1989) e que possui seus níveis mais elevados encontrados quando nos estágios de maior atividade de remodelação óssea (CHEN; TIAN; YU, 2012).

Neste processo estão presentes também as proteínas ósseas morfogenéticas (BMP), que pertencem à superfamília do Fator de Transformação do Crescimento (TGF- β) e que desempenham papel proliferativo em diferentes tipos celulares. Além da diferenciação de células mesenquimais em células da linhagem osteoblástica (ISSA et al., 2006) e, mais especificamente para a BMP-2/4, do aumento da liberação de OC em células-tronco mesenquimais (HUANG et al., 2010).

As BMPs atuam na formação embrionária e pós-natal do esqueleto. Sua sinalização ocorre por meio de receptores tipo I e tipo II que estimulam moléculas Smads, que, quando fosforiladas, se complexam e são internalizadas nos núcleos de osteoblastos. Neste momento, há interação com um fator de transcrição chamado de Runx2 (*Runt-related transcription factor*), essencial para a diferenciação de

osteoblastos e ativação da deposição óssea (ZOFKOVA, 2015). Estas proteínas, bem como a fosfatase alcalina, são utilizadas como importantes marcadores para o processo de deposição óssea (MCPHERSON; PINCUS, 2012).

O osteoblasto é a célula responsável pela síntese da matriz óssea e seu principal produto de secreção é o colágeno tipo I, além de proteínas e alguns fatores de crescimento. A matriz óssea é submetida constantemente ao processo de reabsorção, o qual é executado por osteoclastos. (VARGAS; AUDI; CARRASCOSA, 1997). Os osteoclastos atuam na reabsorção óssea, produzindo íons de hidrogênio para mobilizar minerais e enzimas proteolíticas, havendo a hidrólise da matriz orgânica (MCPHERSON; PINCUS, 2012). Dentro desta matriz, há uma rede lacuno-canalicular onde os osteoblastos são aprisionados, originando os osteócitos. Estes últimos são incorporados em uma matriz com proteoglicanos e sua organização permite a resposta óssea à carga mecânica (HAN et al., 2004).

Sendo assim, o metabolismo ósseo é regulado através da interação de fatores sistêmicos e locais que são capazes de manter a estrutura óssea (BATAILLE et al., 2012). Dentre estes fatores, o paratormônio e a calcitonina exercem notável influência. Em condições fisiológicas, quando há uma redução na calcemia, as glândulas paratireoides secretam o paratormônio (PTH), que é um hormônio que estimula indiretamente a ação dos osteoclastos. Isto porque, ele estimula osteoblastos e seus precursores a produzirem e expressarem RANKL. Este ligante, por sua vez, ativa o receptor RANK que é expresso na superfície de osteoclastos e de seus precursores, o que promove a liberação de cálcio e fosfatos para o meio extracelular e estimula a reabsorção óssea (MCPHERSON; PINCUS, 2012). Por outro lado, o aumento da calcemia resulta em aumento na expressão de calcitonina, a qual mobiliza os íons de cálcio para o interior da matriz óssea, contribuindo no processo de deposição óssea. Neste contexto, a calcitonina atua aumentando a expressão de OPG. A OPG, secretada pelos osteoblastos, é capaz de se ligar ao RANKL, impossibilitando a interação RANK-RANKL, fundamental para a osteoclastogênese (LACEY et al., 1998).

De fato, o eixo RANK/RANKL/OPG pode ser influenciado por diferentes fatores, incluindo os processos infecciosos. Neste contexto, os microrganismos estimulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6). Estas citocinas são importantes mediadores do processo de diferenciação de osteoclastos e do remodelamento ósseo por serem capazes de estimular a via de sinalização RANKL/RANK/OPG (TANAKA;

NAKAYAMADA; OKADA, 2015; CROTTI et al., 2015). Além disso, estas citocinas também são capazes de estimular a expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs), importantes mediadores da degradação de tecidos moles (GARLET et al., 2004; BENEDETTO et al., 2013).

Assim sendo, a presença de doenças associadas ao aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias tem sido fortemente relacionada ao aumento na reabsorção óssea (D'AMELIO et al., 2011; SCHETT, 2011; SHAW; GRAVALLESE, 2016).

3.2 DOENÇAS PERIODONTAIS

O periodonto engloba os tecidos de suporte e de recobrimento dos dentes, sendo composto por periodonto de proteção (gengiva, epitélio juncional e inserção conjuntiva) e pelo periodonto de sustentação (ligamento periodontal, cemento e osso alveolar). O periodonto de proteção protege os tecidos subjacentes do trauma da mastigação e de invasão microbiana, enquanto que o periodonto de sustentação constitui o aparato de inserção dos dentes (NEWMAN et al., 2011).

Quando o periodonto de proteção é acometido, dá-se início às chamadas doenças periodontais, que são caracterizadas como doenças inflamatórias crônicas oriundas da presença de microrganismos organizados na estrutura de biofilmes bucais (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005).

As doenças periodontais podem ser classificadas em dois grandes grupos, sendo a gengivite e a periodontite. A gengivite, caracterizada pela presença de inflamação confinada ao periodonto de proteção, logo, inclui somente o tecido gengival. Neste processo, observa-se intensa resposta vascular e infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (FABRI et al., 2014). Já a periodontite envolve o periodonto de sustentação, sendo caracterizada pela presença de reabsorção do osso alveolar. Esta doença é definida pela Academia Americana de Periodontologia como uma inflamação dos tecidos de suporte dos dentes, com uma alteração progressiva destrutiva, uma vez que o ligamento periodontal tem um importante papel no metabolismo do osso alveolar, ocasionando a perda óssea, caracterizando-se por uma doença de origem multifatorial (LISTGARTEN, 1994; ARMITAGE, 2004).

Dados epidemiológicos revelaram um relevante aumento na prevalência das doenças periodontais na última década, enfatizando a detecção da doença na forma

grave, acometendo cerca de 11% da população mundial (KASSEBAUM et al., 2014). No Brasil, o estudo de Palma e Leite (2014) revelou que, na região norte, adultos entre 35 e 44 anos de idade possuíam prevalência de doenças periodontais de 91,7%, sendo que este índice é observado em ainda maiores proporções, quando se trata da população idosa.

A etiologia das doenças periodontais é composta por múltiplos fatores como o envelhecimento, consumo de tabaco, estresse, fatores socioeconômicos, doenças sistêmicas, entre outros. Contudo, a doença periodontal ocorre somente na presença de biofilme no espaço subgengival (CRONIN; CLAFFEY; STASSEN, 2008; BARBATO et al., 2015).

O microambiente periodontal é comumente colonizado por agentes infecciosos tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* e *Prevotella intermedia*, que são microrganismos anaeróbicos Gram-negativos (CASTILLO et al., 2011).

A parede celular das bactérias Gram-negativas apresenta um importante fator de virulência, descrito como lipopolissacarídeos (LPS). Os LPS são potentes ativadores de células fagocíticas no local da inflamação e capazes de aumentar a síntese e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (ZOU; BAR-SHAVIT, 2002). Além disso, os LPS são potentes estimuladores da reabsorção óssea em doenças inflamatórias (NAIR et al., 1996; SUDA et al., 2004) capazes de suprimir a expressão de OPG, estimular a expressão de RANKL na superfície de osteoblastos e estes são induzidos a secretar IL-1 e TNF- α (ZOU; BAR-SHAVIT, 2002). A IL-1 produzida por macrófagos e/ou monócitos, possui dois tipos conhecidos: IL-1 α e IL-1 β . A IL-1 β provoca ativação de ciclooxigenase-2, gerando prostaglandinas, substância P, óxido nítrico (NO), entre outros produtos da inflamação. O TNF- α é uma citocina de tempo de meia-vida curto, porém de aparecimento precoce nos locais lesados, sendo capaz de ativar outras citocinas (OLIVEIRA et al., 2011).

Estudos demonstraram que IL-1 β e TNF- α são potentes indutores e geradores de uma regulação positiva na formação de IL-6, que é uma citocina de grande relevância na osteoclastogênese (BELLIDO et al., 1995; ISHIMI et al., 1990). A presença destas citocinas no microambiente periodontal também está associada ao aumento na expressão de MMPs, as quais estão relacionadas com a degradação dos tecidos não mineralizados (GARLET et al., 2004; SOUZA et al., 2012; FRANCO et al., 2017).

Assim sendo, estudos têm demonstrado que a presença de doenças que estimulam a síntese de mediadores pró-inflamatórios tais como artrite reumatoide e diabetes exacerbam ou, até mesmo, induzem alterações periodontais (CLAUDINO et al., 2007; KING, 2008; MATEEN et al., 2017). Além disso, a obesidade, consumo de álcool, fumo, estresse também exercem notável influência na homeostasia do microambiente periodontal (GENCO; BORGNAKKE, 2013; HEITZ-MAYFIELD, 2005).

A primeira associação feita entre obesidade e doença periodontal ocorreu em 1977 (PERLSTEIN; BISSADA, 1997) e esta foi explanada através da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α por células do tecido adiposo abdominal, aumentando a inflamação gengival, o que promoveria destruição de osso alveolar e de tecido conjuntivo. Entretanto, esta via pode ser interpretada com dualidade e seus mecanismos ainda não estão completamente estabelecidos (KELLER et al., 2015).

O consumo de álcool já vem sendo relatado como prejudicial em caráter sistêmico e também para a cavidade bucal (PARK et al., 2014). Isto foi bem demonstrado no estudo de LAGES e seus colaboradores (2015), quando um grupo de indivíduos dependentes de álcool foi avaliado em relação a outros grupos. Na população de interesse, verificou-se a presença de patógenos importantes da doença periodontal no biofilme subgengival, além de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α na saliva dos mesmos, sinalizando uma influência negativa da relação da substância para a progressão da doença.

Outra condição importante para o desenvolvimento das doenças periodontais é o uso de tabaco, o que resulta em aumento na expressão de mediadores pró-inflamatórios como as interleucinas (HOLT, 1987; PALMER et al., 2005). Além do prejuízo para a saúde bucal do próprio fumante, estudos vêm demonstrando a influência deletéria do tabaco aos fumantes passivos (JAVED; AHMED; ROMANOS, 2014; RIBEIRO et al., 2017). O estresse psicológico também foi relacionado às doenças periodontais por meio de vários mecanismos biológicos, incluindo o aumento na expressão de IL-6 e das catecolaminas (AKCALI et al., 2013).

Além destes fatores ambientais, a inter-relação entre diferentes doenças vem sendo relatada. Neste contexto, a ocorrência de qualquer anormalidade adicional distinta durante o curso clínico de uma doença de base estudada, caracteriza o conceito de comorbidade (FEINSTEIN, 1970). Sendo assim, diversos estudos já demonstraram a influência da artrite reumatoide sobre as doenças periodontais

(FIRESTEIN, 2003; ARAÚJO; MELO; LIMA, 2015; MCGRAW et al., 1999, QUEIROZ-JUNIOR et al., 2012). Da mesma forma, foi demonstrado que a indução do diabetes resultou também na indução de doenças periodontais em ratos (LIM et al, 2007; CLAUDINO et al., 2007; CLAUDINO et al., 2012).

O meio de comprometimento destas duas doenças crônicas pode ser interpretado como um mecanismo de duas vias. Considerando o diabetes como exemplo, a hiperglicemia crônica aumenta a prevalência e a severidade das doenças periodontais, sendo que a presença de doenças periodontais também exerce influência, dificultando o controle da glicemia (PRESHAW et al., 2012; CASANOVA; HUGHES; PRESHAW, 2014; NAGPAL; YAMASHIRO; IZUMI, 2015).

Atualmente, alguns estudos têm descrito a hipótese da translocação do sítio de ação dos patógenos causadores de periodontite, presentes na microbiota subgengival, para a corrente sanguínea (FIGUERO et al., 2014). Assim, os autores descrevem que os microrganismos presentes no biofilme subgengival seriam passíveis de disseminação pela corrente sanguínea, o que aumentaria a expressão de mediadores pró-inflamatórios e induziria a resposta inflamatória em diferentes sistemas biológicos (CULLINAN; SEYMOUR, 2013).

Ainda no contexto de que a doença periodontal se mostra capaz de afetar a saúde sistêmica está o estudo de Nakajima e colaboradores (2015), onde a administração oral de *P. gingivalis* foi capaz de alterar a microbiota intestinal e provocar endotoxemia, levando à inflamação sistêmica e resistência à insulina. Desta forma, o efeito da infecção periodontal sobre o osso alveolar já é bem estabelecido. Contudo, sua influência na homeostase óssea em âmbito geral permanece parcialmente elucidada (ANBINDER et al., 2016), principalmente no que se refere a doenças sistêmicas.

3.3 SEPSE

A primeira definição de sepse foi publicada em 1992 como uma reposta sistêmica a uma infecção instalada ou suspeita onde há presença de pelo menos dois sinais da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), podendo ser anormalidade na temperatura corporal, na frequência cardíaca, respiratória ou contagem de leucócitos (BONE et al., 1992). Por não se tratar de um conceito adequado, outras definições foram criadas (LEVY et al., 2003) até que se

considerasse a sepse como uma “disfunção orgânica com risco de vida causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção” (SHANKAR-HARI et al., 2016). Seus índices de mortalidade estão diretamente relacionados ao número de órgãos que falham no organismo (DELLINGER et al., 2013) e alterações no metabolismo energético e imunológico (STEARNS-KUROSAWA et al., 2011).

Esta situação se tornou um problema de saúde pública, pois é a principal causa de morte em UTIs em todo o mundo (JUNIOR; SILVA, 2014), ocupa 25% dos leitos no Brasil (ILAS, 2015) e nos Estados Unidos da América (EUA) mata por ano cerca de 200.000 pessoas. Além destes índices, sabe-se atualmente que, pacientes com sepse ou choque séptico podem apresentar a “doença crítica persistente” (PCI - “*persistent critical illness*”) em que os sobreviventes enfrentam risco de morte precoce e disfunção cognitiva, neuropatias, miopatias e disfunções imunológicas (DEUSTCHMAN; TRACEY, 2014).

Estudos comprovam que a incidência de sepse está aumentando a uma taxa de 1,5% ao ano devido à crescente resistência aos antibióticos disponíveis no mercado, ao alto tempo de internações em UTIs (GARCIA-LÓPEZ et al., 2017), ao elevado número de pacientes vivendo com comorbidades e imunocomprometidos e ao grande envelhecimento da população (WIERSINGA, 2011).

Os microrganismos mais predominantes nos casos de sepse são *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Acinetobacter sp.* e *Pseudomonas sp.* E estes são também os microrganismos mais frequentemente envolvidos nos mecanismos de resistências às múltiplas drogas (YASEMIN et al, 2016).

A síndrome é dividida em duas fases: a inicial, onde existem maiores chances de cura, quando utilizados antibióticos adequados e terapias que garantam a oxigenação tecidual; a forma tardia refere-se a infecções secundárias ainda mais debilitantes (PEDRO; MORCILLO; BARACAT, 2015). Inclusive em modelos animais, a injúria ao sistema nervoso autônomo e à função cardíaca já foi correlacionada com a gravidade da sepse (PINTO et al., 2016).

Para que um microrganismo consiga colonizar o hospedeiro, é necessário que as barreiras inerentes à resposta imune inata sejam rompidas. Assim, após a invasão do patógeno, é iniciada uma resposta inflamatória como primeira linha de defesa celular, visando a fagocitose do patógeno por meio da liberação de citocinas e mediadores inflamatórios (XIE et al., 2014). Estas moléculas são responsáveis por

direcionarem a migração das células imunes para o local da infecção e regularem a resposta inflamatória (SCHULTE; BERNHAGEN; BUCALA, 2013). Ao mesmo tempo, inicia-se a resposta relacionada à imunidade adaptativa, por meio da apresentação de antígenos e recrutamento de linfócitos (TRAVIS, 2009; KUMAGAI; AKIRA, 2010). Quando esta reação se torna exacerbada e desregulada, o organismo passa por uma fase pró-inflamatória inicial seguida por um estado de imunossupressão. Neste momento inicial da fase aguda, a intensa liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ (interferon gama), leva a uma ativação da resposta imune inata ou adaptativa, seguida então pela produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (interleucina-10), IL-4 (interleucina-4) e TGF- β . Entretanto, esta situação não ocorre como um modelo estático e é caracterizada por um processo altamente dinâmico e interativo que gera disfunção endotelial, ocasionando sinais clínicos como hipotensão, hemoconcentração e alteração de órgãos remotos (SCHULTE; BERNHAGEN; BUCALA, 2013).

A sepse pode ser consequência de uma série de condições clínicas como nos casos de lesão renal aguda, que, quando associadas, aumenta-se o risco de desenvolvimento de doença renal crônica pelos sobreviventes (ZARBOCK; GOMEZ; KELLUM, 2014); bem como nos casos de encefalopatia, demonstrados pelo consequente aumento de biomarcadores de danos cerebrais devido ao processo inflamatório (IACOBONE et al., 2009).

Além destas circunstâncias, a síndrome também está presente em condições clínicas como no pós-operatório de cirurgias ortopédicas, por se tratar de uma situação em que são prescritos corticosteroides que causam imunossupressão e pelo eventual uso de ventilação mecânica destes pacientes (LAKOMKIN et al., 2017).

Mesmo diante de tantos avanços terapêuticos na medicina, novos tratamentos intervencionistas voltados para a sepse não estão obtendo sucesso (BROWN et al., 2016), e os pacientes que sobrevivem à sepse, normalmente, acabam apresentando incapacidades físicas, psicológicas e cognitivas a longo prazo, o que implica em problemas sociais e aumento de cuidados de saúde significativos (PRESCOTT et al., 2014).

Em relação a este aumento de cuidados para esta população, pouco têm-se estudado se a síndrome é capaz de afetar o metabolismo ósseo da mesma maneira que em outros sistemas (HINKELBEIN et al., 2010; ANTONUCCI et al., 2014; HOCKER, WIJDICKS, 2014), embora se saiba que os pacientes internados em UTIs

possuem chances elevadas de desenvolverem doenças ósseas desencadeadas pela reabsorção óssea mediada por osteoclastos (NIERMAN; MECHANICK, 1998; HOLLANDER; MECHANICK, 2009; KOCH et al., 2017). Neste sentido, o trabalho de SMITH e colaboradores (2012) demonstrou haver um aumento de reabsorção óssea em pacientes durante a fase aguda da sepse. Além disto, há também uma recente descoberta em torno de um estudo genético em que se constatou uma expressão aumentada de genes do metabolismo ósseo em pacientes com choque séptico (MUKHOPADHYAY et al., 2017).

Diante das situações expostas, pode-se perceber que a compreensão dos diversos fatores que afetam os pacientes com sepse é de grande importância tanto do ponto de vista social quanto do econômico (KUMAR G et al., 2011). Trata-se de uma doença complexa e que exige entendimento mais profundo sobre áreas variadas.

Diversos estudos têm abordado a sepse de forma experimental, sendo que diferentes metodologias vêm sendo demonstradas para a indução de sepse. A administração endovenosa de LPS, chamada de endotoxemia, ou a administração da própria cepa de bactéria, bacteremia, são medidas práticas e reproduzíveis em diferentes modelos experimentais (BENJAMIM, 2001; REMICK et al., 2000).

Além disso, pode-se provocar uma injúria intestinal que leve à liberação da microbiota bacteriana. Esta técnica pode ser feita pela CLP (*cecal ligation and puncture*), que é a ligação e perfuração do ceco ou pela CASP (*colon ascendens stent peritonitis*), uma introdução de cateter no cólon ascendente. As duas técnicas promovem liberação gradativa do conteúdo intestinal para o meio peritoneal, induzindo peritonite que pode evoluir para um quadro de sepse ou choque séptico (BENJAMIM, 2001; WICHTERMANN et al., 1980).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SUBMISSÃO À COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) EM PESQUISA.

Os animais utilizados neste trabalho foram oriundos de um projeto distinto submetido à CEUA da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) aprovado pelo protocolo de número 45/15 (Anexo 1) e na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) foi configurada dispensa de aprovação pela CEUA (Anexo 2). Portanto, este projeto é uma parceria entre a UEPG e a UFU.

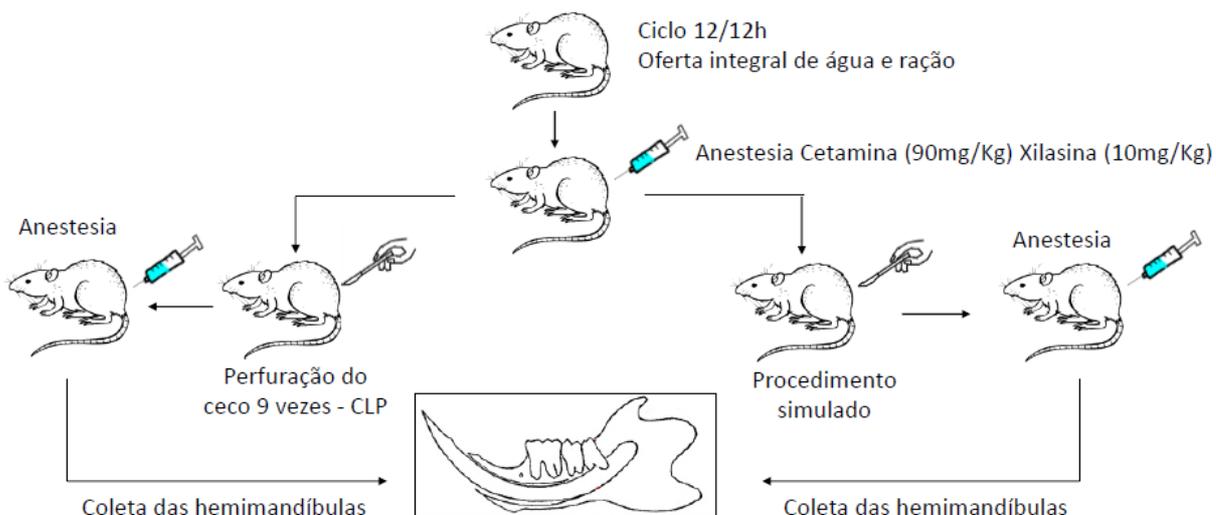
Foram utilizados 12 animais obtidos do biotério da UFU divididos em dois grupos: grupo de animais sépticos (n=6) e não-sépticos (n=6). Os animais eram ratos machos *Wistar*, com peso entre 200 a 300 gramas, que passaram por ciclo claro/escuro de 12 horas, ficaram em temperatura ambiente ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e com oferta integral de água e ração.

4.2 MODELO EXPERIMENTAL CLP (*CECAL LIGATION AND PUNCTURE*) DE INDUÇÃO DE SEPSE

Os ratos foram anestesiados por injeção intraperitoneal com cloridrato de cetamina (90mg/kg) e cloridrato de xilasina (10mg/kg) e, posteriormente, realizou-se uma laparotomia onde houve a exposição do ceco e sua perfuração com agulha de 21 gauge por nove vezes. O ceco foi delicadamente apertado para que houvesse o extravasamento do material fecal através da perfuração. A incisão realizada foi suturada, os animais retornaram para suas gaiolas e foram observados por um período de oito horas. O grupo não-séptico passou por um procedimento simulado da cirurgia, ou seja, foi submetido ao estresse da prática, porém, sem a perfuração do ceco (SANTIAGO et al., 2013).

Vinte e quatro horas depois deste procedimento, os animais foram novamente anestesiados, desta vez com sobre dose anestésica, para realizar a coleta das mandíbulas, certificando-se de que não havia mais reflexo corneano palpebral e o reflexo de retirada da pata ao pinçamento digital. As mandíbulas foram removidas por dissecação e foram posteriormente divididas em duas partes (hemimandíbulas).

FIGURA 1 - Esquema de indução da sepse dos animais e coletas do material de interesse.



Fonte: O autor.

O material foi fixado em solução de formalina tamponada a 10% por 48 horas submetido aos procedimentos histotécnicos.

4.3 PROCEDIMENTOS HISTOTÉCNICOS

Após a fixação, as peças foram submetidas ao processo de descalcificação com solução de ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), pH 7,2. O processo de desmineralização foi realizado em aproximadamente 40 dias com trocas da solução a cada três dias.

Posteriormente, as peças foram submetidas à clivagem, visando facilitar a localização das regiões de interesse. Os materiais foram alocados em cassetes e, em seguida, as amostras foram desidratadas com álcool 70%, 80%, 95% e álcool absoluto. Na sequência, as peças foram diafanizadas em xilol para posterior inclusão em parafina e os blocos submetidos a cortes longitudinais que englobassem a região do primeiro molar com 5 μ m de espessura por meio de um micrótomo (Leica, RM 2125T, Nussloch, Alemanha).

Foram obtidos três cortes semi-seriados para cada animal, os quais foram submetidos a coloração com Hematoxilina de Harris e Eosina de Lison (HE) e posteriormente avaliados por microscopia de luz (Olympus BX41, Tokyo, Japão). A análise microscópica foi realizada em três regiões distintas, sendo elas: osso alveolar, osso da área da furca e ligamento periodontal (Quadro 1).

QUADRO 1 - Regiões das hemimandíbulas e suas características avaliadas.

Região da hemimandíbula	Campos (ampliação 100x)	Características da região
Ligamento periodontal	13 campos	Fibras colágenas, fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos e espaços em branco*.
Ossos alveolar	5 campos	Matriz óssea, osteócitos, vasos sanguíneos, medula óssea e células inflamatórias.
Ossos da furca	5 campos	Matriz óssea, osteócitos, vasos sanguíneos, medula óssea e células inflamatórias.

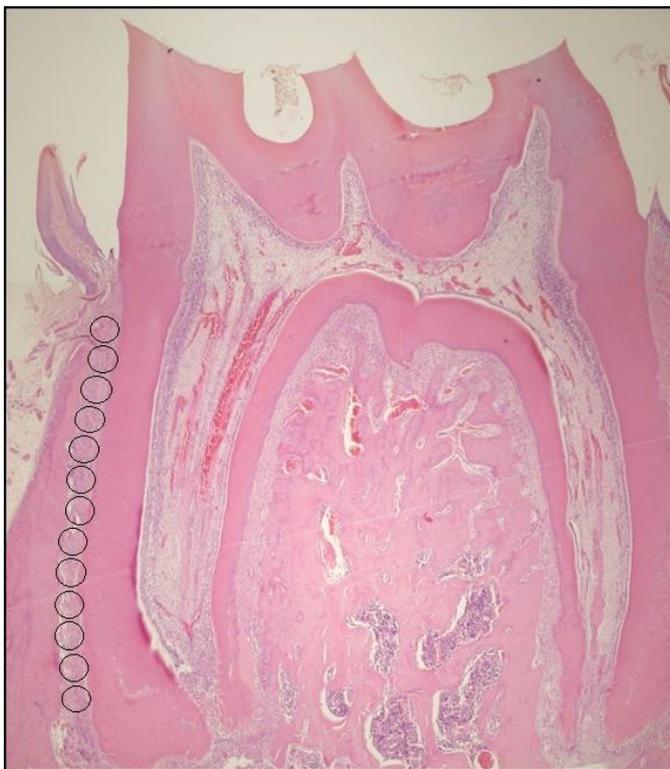
*Os espaços em branco correspondem ao espaço ocupado pelo líquido intercelular e/ou pelo exsudato inflamatório.

Fonte: O autor.

4.3.1 Análise histomorfométrica

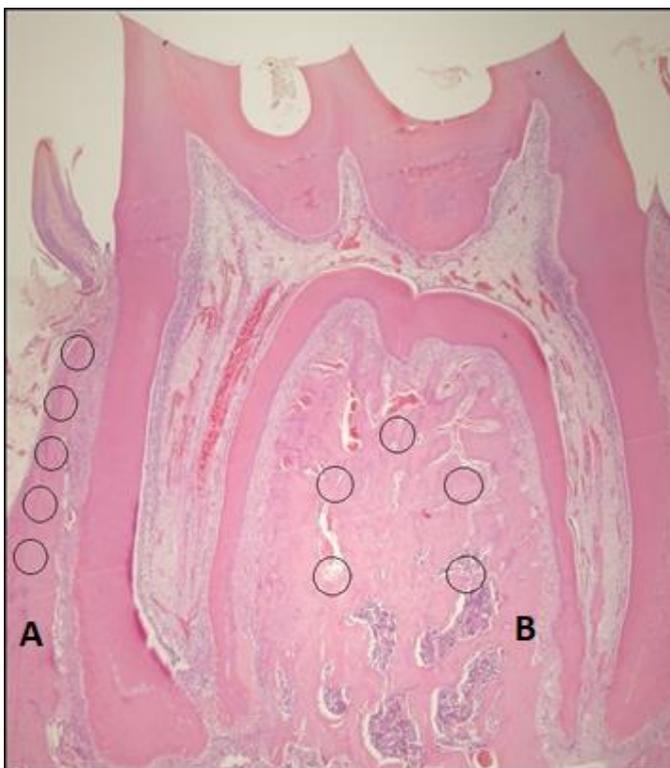
Por meio da plataforma Olympus CellSens (CellSens Software 1.6, Tokyo, Japão), foram capturadas as imagens com a objetiva de imersão (ampliação de 100x). Para análise do ligamento periodontal foram visualizados 13 campos, contemplando todo o espaço ocupado pelo ligamento periodontal. Ou seja, a análise foi iniciada imediatamente acima da crista óssea do osso alveolar seguindo até a proximidade com o ápice radicular (Figura 2). Para análise da região da furca e do osso alveolar, foram escolhidos 5 campos dispostos conforme imagem (Figura 3).

FIGURA 2 - Distribuição dos campos para análise de morfometria do ligamento periodontal.



Visão geral do primeiro molar do rato em coloração HE (ampliação 4x).
Fonte: O autor.

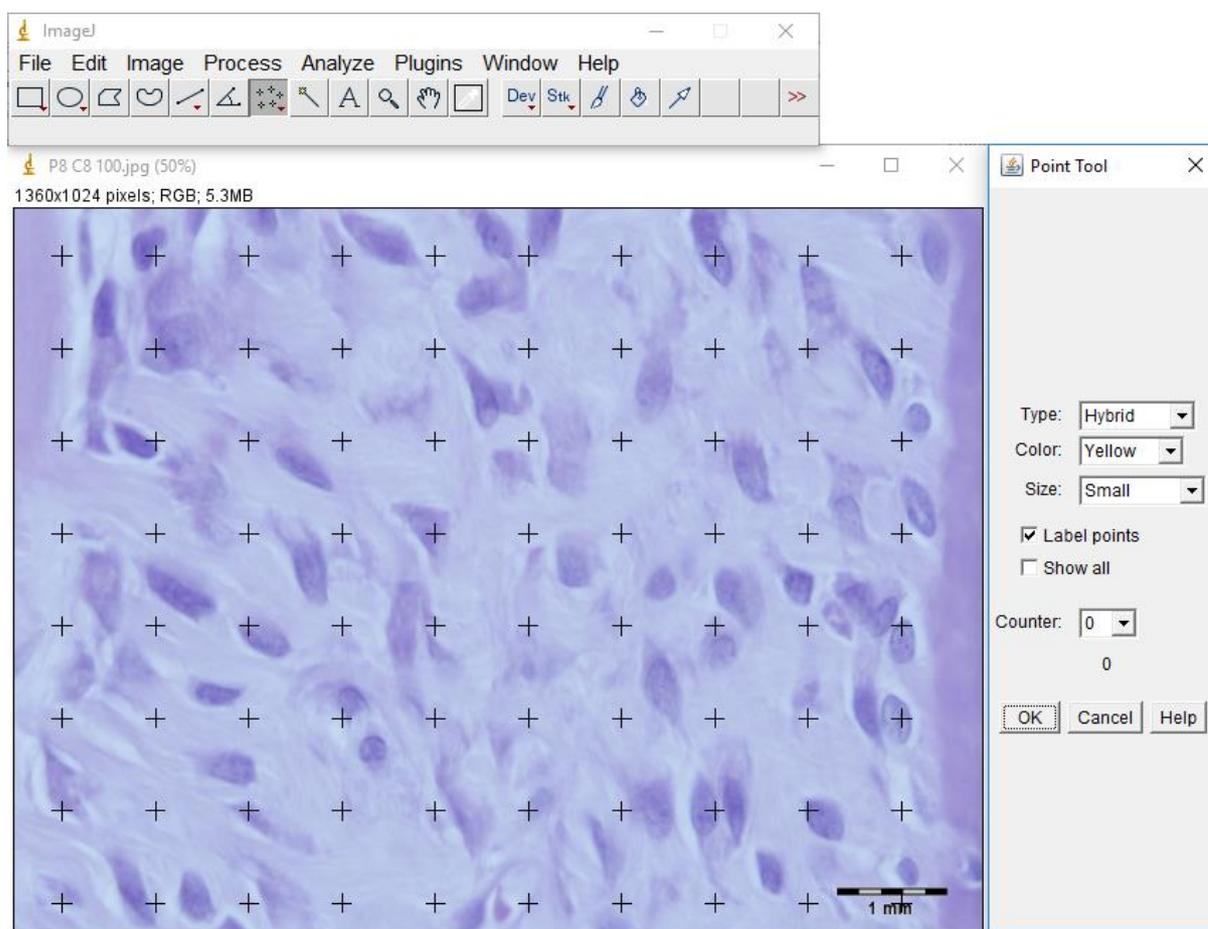
FIGURA 3 - Distribuição dos campos para análise de morfometria do osso alveolar (A) e do osso da furca (B).



Visão geral do primeiro molar do rato em coloração HE (ampliação 4x).
Fonte: O autor.

A análise morfométrica foi realizada utilizando o programa ImageJ (ImageJ 1.50i, Bethesda, MD, Estados Unidos) visando a identificação e quantificação das estruturas. Utilizou-se o plugin “Grid” que seccionava as imagens em 80 pontos equidistantes e as contagens foram realizadas com auxílio do plugin “Point tool”, onde cada estrutura era marcada e contada exatamente nestes pontos de intersecções para todos os campos (Figura 4). Para obtenção dos percentuais, o total das contagens destes 80 pontos foram transformados em 100% e de posse destas informações para cada campo e região, os dados foram plotados em uma planilha (Windows Excel, Microsoft, Redmond, WA, Estados Unidos) para a análise estatística.

FIGURA 4 - Software ImageJ para identificação e contagem das estruturas de interesse na região do ligamento periodontal para animal do grupo controle.

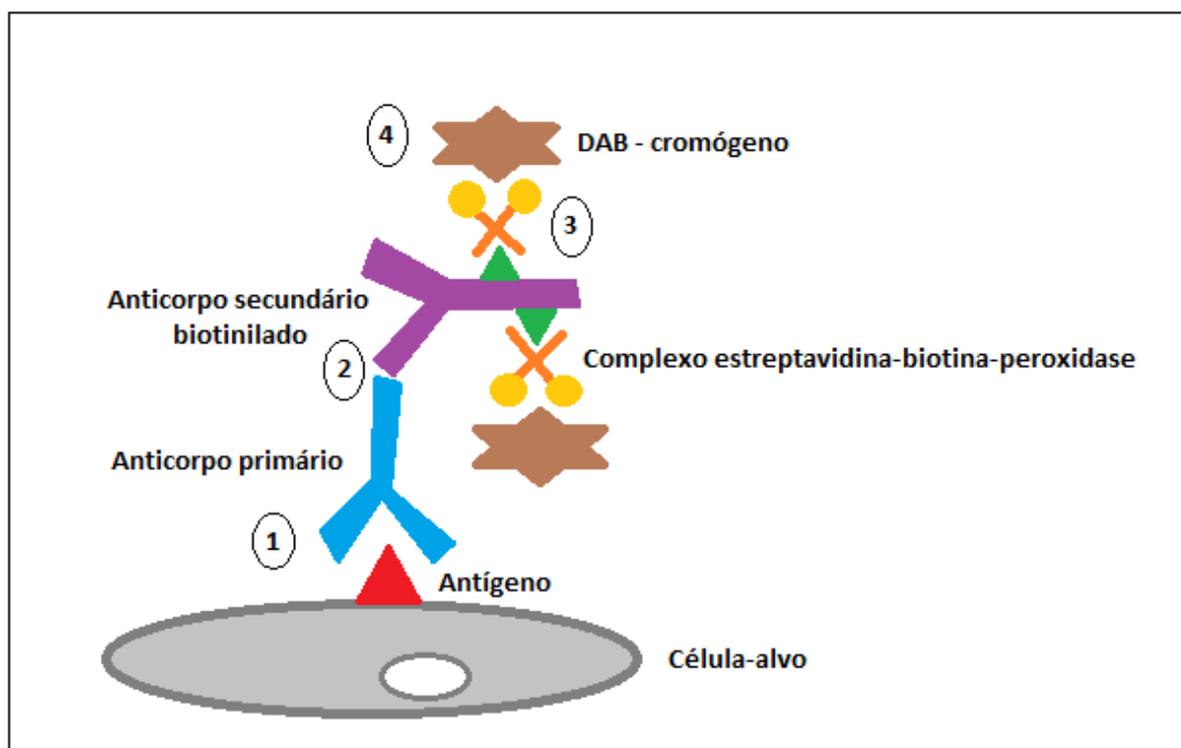


Aplicação do plugin “Grid” para seccionar as imagens e do plugin “Point Tool” para auxiliar na contagem das diferentes estruturas após a divisão em 80 pontos equidistantes.
Fonte: O autor.

4.4 PROCEDIMENTOS IMUNOHISTOQUÍMICOS

A imunohistoquímica é uma técnica utilizada para identificar e localizar proteínas específicas empregando anticorpos. Os cortes histológicos foram submetidos à imunomarcagem pelo método estreptavidina-biotina-peroxidase. De forma geral, o sítio antigênico é exposto ao anticorpo primário e, posteriormente, ao secundário, que possui alta afinidade ao anticorpo primário, formando uma ligação entre eles. No caso de anticorpos secundários biotinilados, há uma grande afinidade na ligação com enzimas, servindo como uma ponte entre o complexo estreptavidina-peroxidase e o anticorpo secundário. O complexo enzimático estreptavidina-biotina-peroxidase promove a conversão de um cromógeno incolor em um produto final que atribui cores aos antígenos teciduais marcados. A 3,30-diaminobenzidina (DAB), cromógeno utilizado neste estudo, confere a cor acastanhada aos antígenos (Figura 5) (HSU; RAINE; FANGER, 1981).

FIGURA 5 - Esquema básico da imunomarcagem pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase.



1)Ligação do anticorpo primário com o antígeno específico na célula-alvo. 2)Ligação do anticorpo secundário biotinilado ao anticorpo primário. 3)Ligação do complexo estreptavidina-peroxidase com a biotina do anticorpo secundário. 4)Conversão do cromógeno DAB pelo complexo estreptavidina-peroxidase gerando coloração acastanhada aos antígenos marcados.

Fonte: O autor.

As análises de imunohistoquímica foram realizadas usando o método da estreptavidina-biotina-peroxidase. Para estes experimentos, os cortes parafinados foram desparafinizados com xilol, desidratados com soluções de álcool e a peroxidase endógena foi bloqueada com EnVision™ FLEX por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram colocados em banho com EnVision™ FLEX Wash buffer (Dako) por 3 vezes. Cada banho teve duração de 10 minutos.

Para recuperação dos antígenos, os cortes foram tratados com EnVision™ FLEX Target retrieval solution (Low pH, Dako) por 20 minutos a 97 °C em microondas. Os anticorpos primários para RANKL (sc-7628-Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), osteocalcina (sc-365797-Santa Cruz Biotechnology, Inc.) e BMP-2/4 (sc-137087-Santa Cruz Biotechnology, Inc.) foram utilizados na diluição de 1:50 por 20 minutos em temperatura ambiente em câmara umidificadora.

Após a lavagem, os cortes foram incubados com EnVision FLEX/HRP por 20 minutos em temperatura ambiente, seguido pela incubação com EnVision FLEX substrate solution (Dakocytomation, Glostrup, Denmark) por 5 minutos em temperatura ambiente. A imunoreatividade foi detectada utilizando DAB por 5 minutos (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Em seguida, procedeu-se a contracoloração com hematoxilina de Harris e montagem. Todos os banhos foram realizados por 3 vezes em 10 minutos com EnVision FLEX wash buffer.

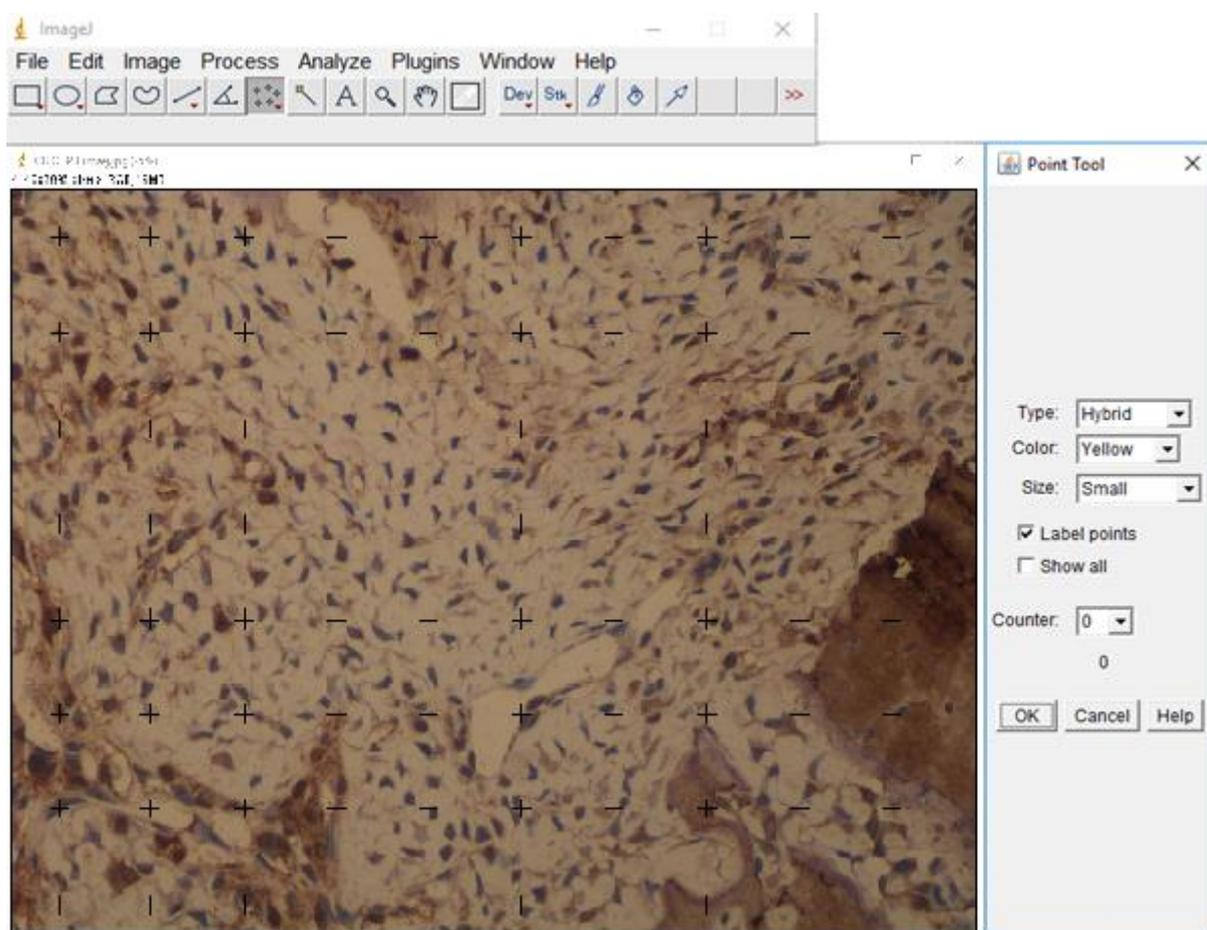
A montagem final das lâminas contou com um meio de montagem aquoso Dako Glycergel Mounting Medium (Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos) e como controle de qualidade para confirmar o desempenho de todos os reagentes utilizados, foi utilizado um controle positivo. Para as marcações de RANKL, utilizaram-se cortes histológicos de doença periodontal avançada e para as marcações de BMP-2/4 e OC, foram utilizados cortes histológicos de tecido ósseo imaturo. Para cada amostra também foi feito o controle negativo, criado por supressão da incubação com o anticorpo primário, para identificar qualquer tipo de coloração inespecífica.

4.4.1 Captura das imagens e avaliação imunohistoquímica

As lâminas foram visualizadas em microscópio e as imagens obtidas em ampliação de 40 vezes foram visualizadas no software ImageJ (ImageJ 1.50i, Bethesda, MD, Estados Unidos) com câmera (Canon EOS Rebel T5) e microscópio binocular de luz (Olympus CX41). A avaliação imunohistoquímica foi realizada

também utilizando o programa ImageJ (ImageJ 1.50i, Bethesda, MD, Estados Unidos) para mensuração das células marcadas com pigmentação castanha característica. Utilizou-se o plugin “Grid” que seccionava as imagens em 80 pontos equidistantes e as contagens foram realizadas com auxílio do plugin “Point tool”, onde cada estrutura era marcada e contada exatamente nestes pontos de intersecções para todos os campos (Figura 5). Para obtenção dos percentuais, o total das contagens destes 80 pontos foram transformados em 100% e de posse destas informações para cada campo e região, os dados foram plotados em uma planilha (Windows Excel, Microsoft, Redmond, WA, Estados Unidos) para a análise estatística.

Figura 6 – Software ImageJ para contagem das imunomarcações na região do ligamento periodontal.



Aplicação do plugin “Grid” para seccionar as imagens e do plugin “Point Tool” para auxiliar na contagem das imunomarcações após a divisão em 80 pontos equidistantes.
Fonte: O autor.

Foram avaliados 15 campos no total, sendo 5 da furca, 5 do ligamento periodontal e 5 do osso alveolar. A quantificação de células positivas foi expressa como o número de células imunomarcadas.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

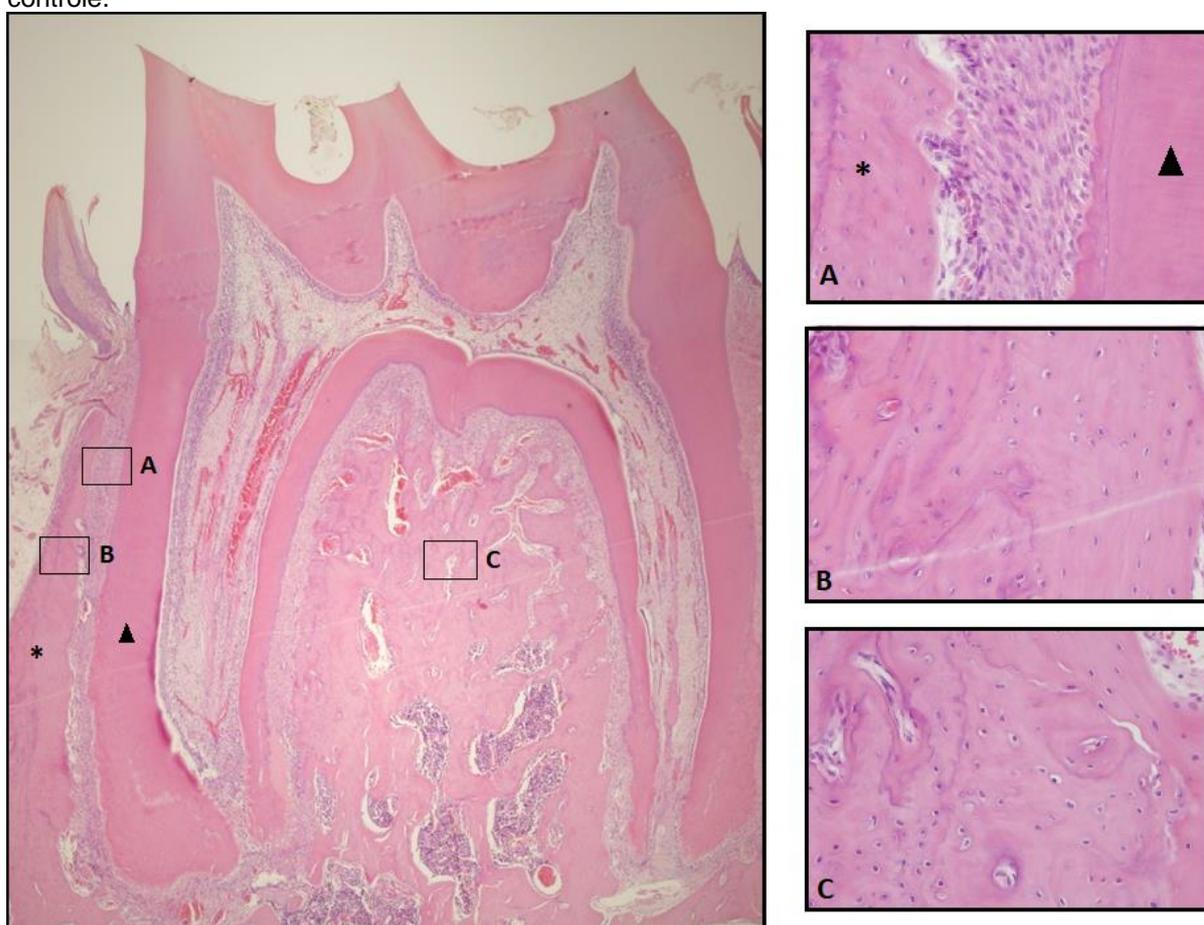
Para os dados dos grupos foi utilizado teste t de Student para avaliar os resultados encontrados na análise histológica e imunohistoquímica. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$ e os cálculos e gráficos foram feitos usando GraphPad Prism 7,0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A análise histológica foi realizada em três regiões distintas, sendo ligamento periodontal, osso alveolar e osso da região de furca. Os resultados das análises morfológicas e morfométricas dos cortes histológicos foram comparadas para cada área em cada grupo estudado (Figura 6 e 7).

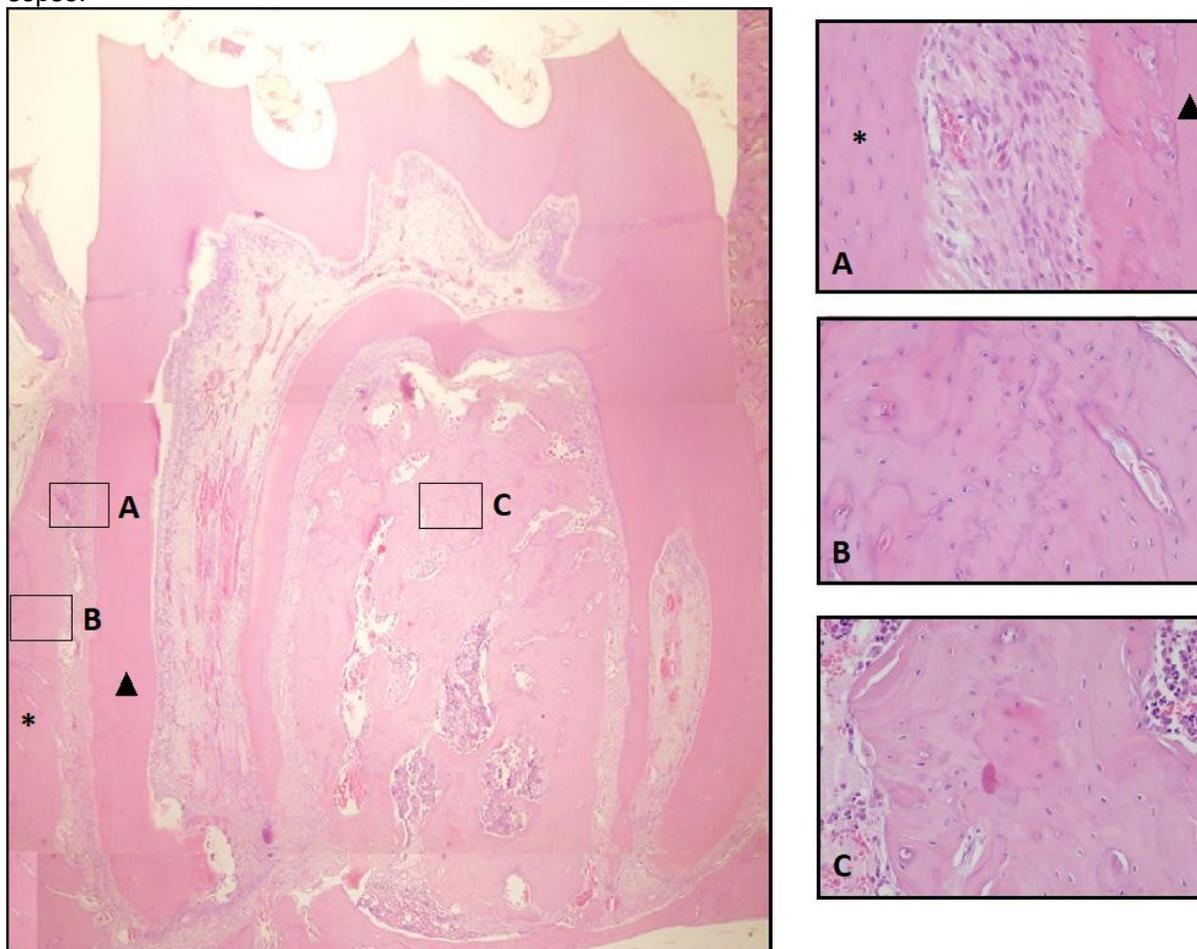
Figura 7- Fotomicrografia representativa do primeiro molar de hemimandíbulas de ratos do grupo controle.



Lado esquerdo da imagem – Visão geral do primeiro molar do rato. Região A – Ligamento periodontal em aumento de 40x. Presença de dentina radicular (▲) e osso alveolar (*) Região B – Osso alveolar em aumento de 40x. Região C – Osso da furca em aumento de 40x. HE.

Fonte: O autor.

FIGURA 8 - Fotomicrografia representativa do primeiro molar de hemimandíbulas de ratos do grupo sepse.

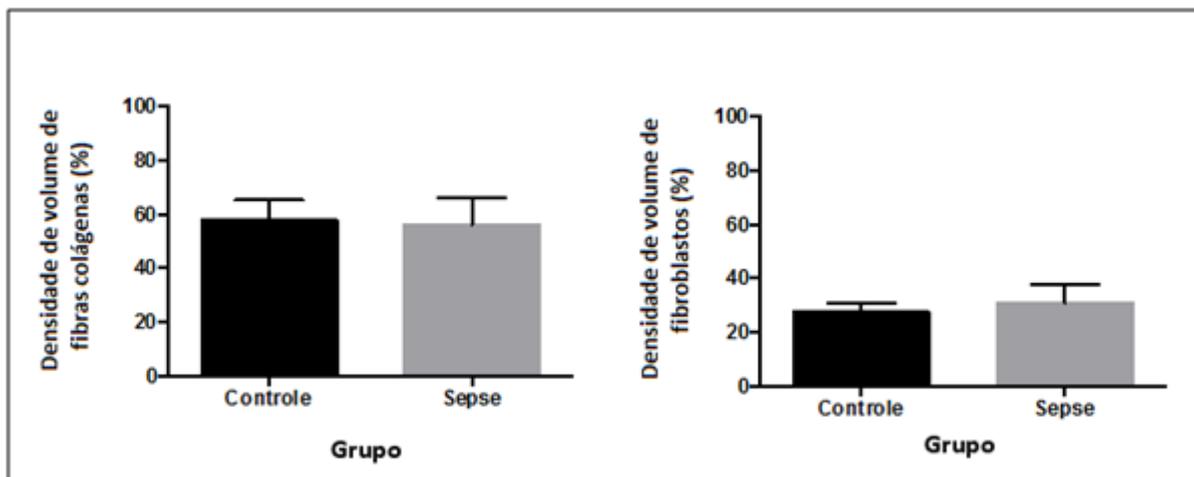


Lado esquerdo da imagem – Visão geral do primeiro molar do rato. Região A – Ligamento periodontal em aumento de 40x. Presença de dentina radicular (▲) e osso alveolar (*) Região B – Osso alveolar em aumento de 40x. Região C – Osso da furca em aumento de 40x. HE.
Fonte: O autor.

5.1.1 Ligamento periodontal

A região do ligamento periodontal foi avaliada em um total de 13 campos pela objetiva de imersão (ampliação de 100x) e as características do ligamento encontradas para os dois grupos estão descritas nos gráficos abaixo.

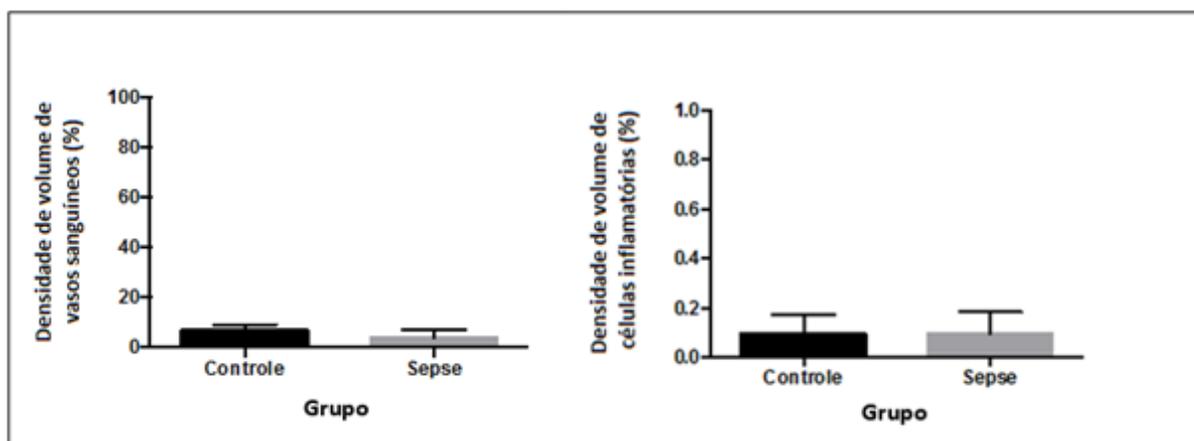
GRÁFICO 1 - Densidade de volume das fibras colágenas e fibroblastos da região do ligamento periodontal nos grupos controle e sepse.



Os resultados representam valores da média e desvio-padrão para cada um dos grupos analisados. Teste t de Student $p > 0,05$. (n=6)

Fonte: O autor.

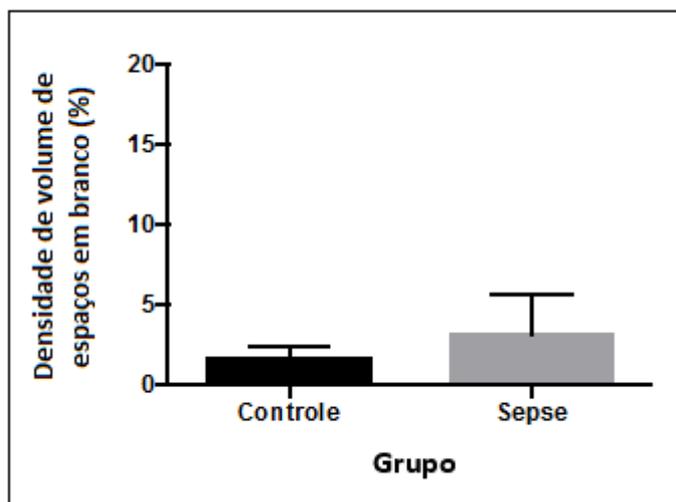
GRÁFICO 2 - Densidade de volume dos vasos sanguíneos e das células inflamatórias da região do ligamento periodontal nos grupos controle e sepse.



Os resultados representam valores da média e desvio-padrão para cada um dos grupos analisados. Teste t de Student $p > 0,05$. (n=6)

Fonte: O autor.

GRÁFICO 3 - Densidade de volume dos espaços em branco da região do ligamento periodontal nos grupos controle e sepse.



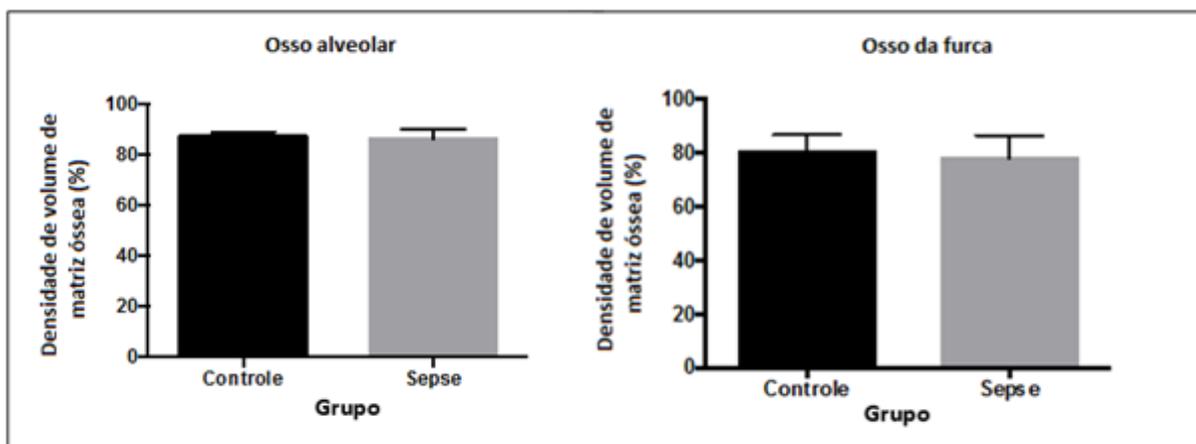
Os espaços em branco podem corresponder ao líquido intercelular e/ou ao exsudato inflamatório. Os resultados representam valores da média e desvio-padrão para cada um dos grupos analisados. Teste t de Student $p > 0,05$. (n=6)
Fonte: O autor.

De acordo com a análise estatística (teste t de Student) a um nível de significância de 95% ($\alpha=0,05$), não houve alterações histológicas de processo inflamatório e não houve diferença significativa entre nenhuma das análises feitas para a região do ligamento periodontal.

5.1.2 Osso alveolar e osso da área de furca

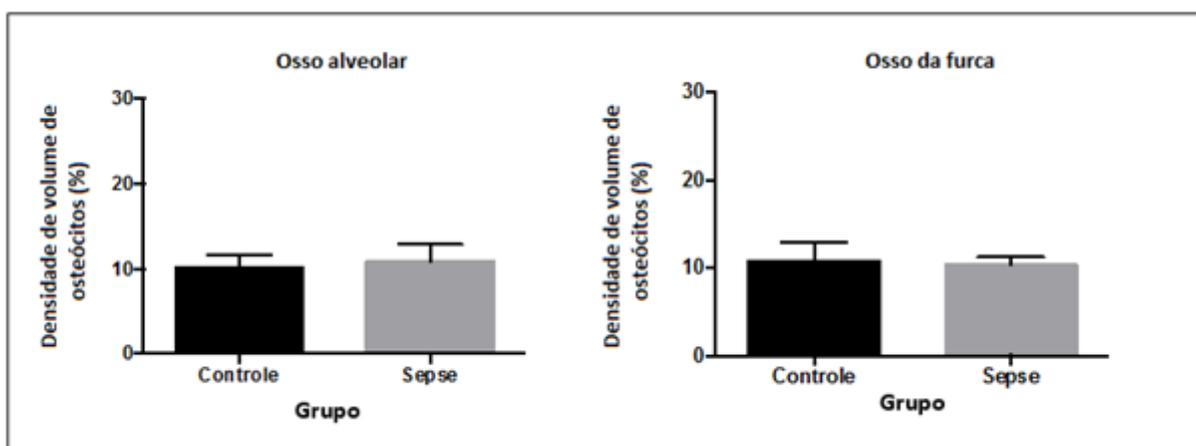
Os dois grupos de animais foram estudados de acordo com os aspectos das regiões do osso alveolar e de furca, onde foram avaliadas as suas características em campos aleatórios previamente estabelecidos.

GRÁFICO 4 - Densidade de volume da matriz óssea da região do osso alveolar e de osso da área de furca nos grupos controle e sepse.



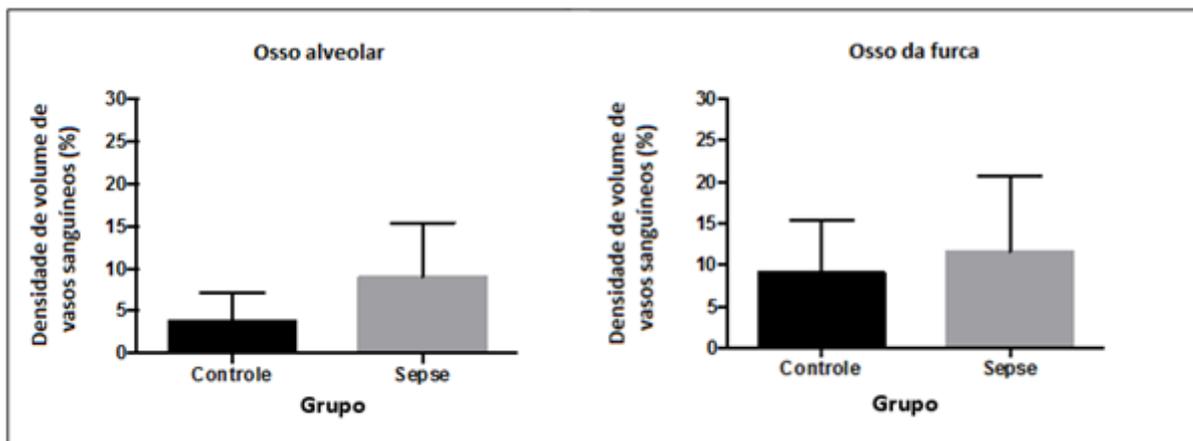
Os resultados representam valores da média e desvio-padrão para cada um dos grupos analisados. Teste t de Student $p > 0,05$. (n=6)
Fonte: O autor.

GRÁFICO 5 - Densidade de volume dos osteócitos da região do osso alveolar e de osso da área de furca nos grupos controle e sepse.



Os resultados representam valores da média e desvio-padrão para cada um dos grupos analisados. Teste t de Student $p > 0,05$. (n=6)
Fonte: O autor.

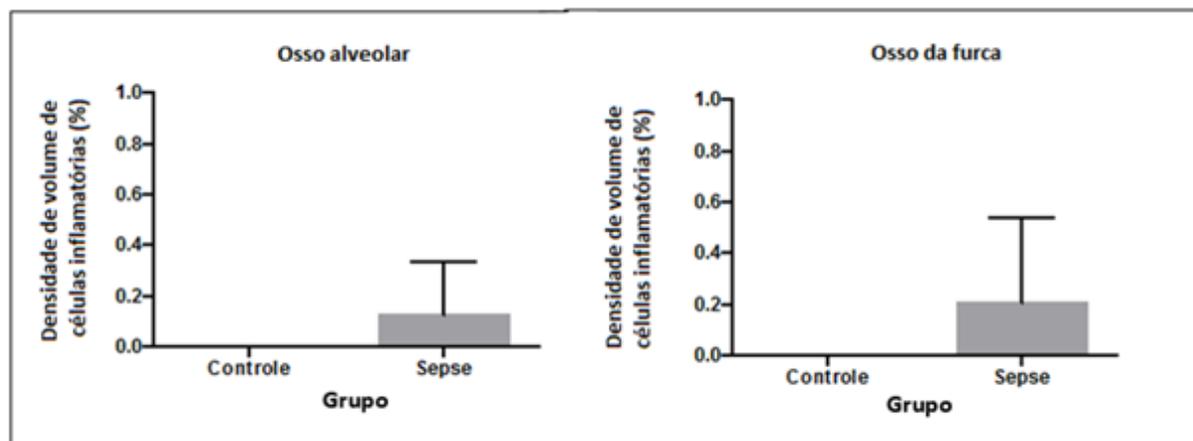
GRÁFICO 6 - Densidade de volume dos vasos sanguíneos da região do osso alveolar e de osso da área de furca nos grupos controle e sepse.



Os resultados representam valores da média e desvio-padrão para cada um dos grupos analisados. Teste t de Student $p > 0,05$. (n=6)

Fonte: O autor.

GRÁFICO 7 - Densidade de volume das células inflamatórias da região do osso alveolar e de osso da área de furca nos grupos controle e sepse.



Os resultados representam valores da média e desvio-padrão para cada um dos grupos analisados. Teste t de Student $p > 0,05$. (n=6)

Fonte: O autor.

De acordo com a análise estatística (teste t de Student) a um nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$), não houve alterações histológicas de processo inflamatório e não houve diferença significativa entre nenhuma das análises feitas para a região do osso alveolar e de osso da área da furca. Contudo, conforme ilustrado no gráfico 7, houve uma discreta tendência a aumento na densidade de volume das células inflamatórias no grupo sepse.

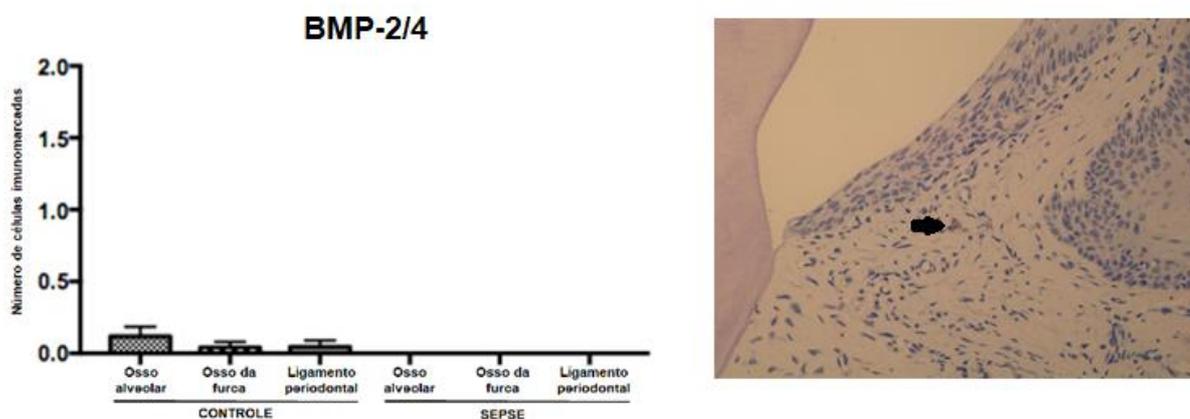
5.2 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

A análise imunohistoquímica foi realizada em três regiões distintas, sendo ligamento periodontal, osso alveolar e osso da região de furca. Os resultados das análises foram comparados para cada área e os controles positivo e negativo revelaram ausência de marcações inespecíficas.

5.2.1 Marcação imunohistoquímica para BMP-2/4

Os dois grupos de animais tiveram os cortes histológicos das hemimandíbulas imunomarcados para BMP-2/4 e avaliados em cinco campos distintos nas regiões do ligamento periodontal, osso alveolar e área da furca, observando-se os seguintes resultados:

GRÁFICO 8 - Imunomarcção para BMP-2/4 nas regiões do ligamento periodontal, osso alveolar e osso da furca dos grupos controle e sepse.



Cortes histológicos das hemimandíbulas provenientes de ratos sépticos e não-sépticos foram analisados em relação ao número de células marcadas para BMP-2/4 (→) através de reações de imunohistoquímica. Os resultados representam valores da média e desvio-padrão para cada um dos grupos analisados.

Teste t de Student $p > 0,05$. (n=6)

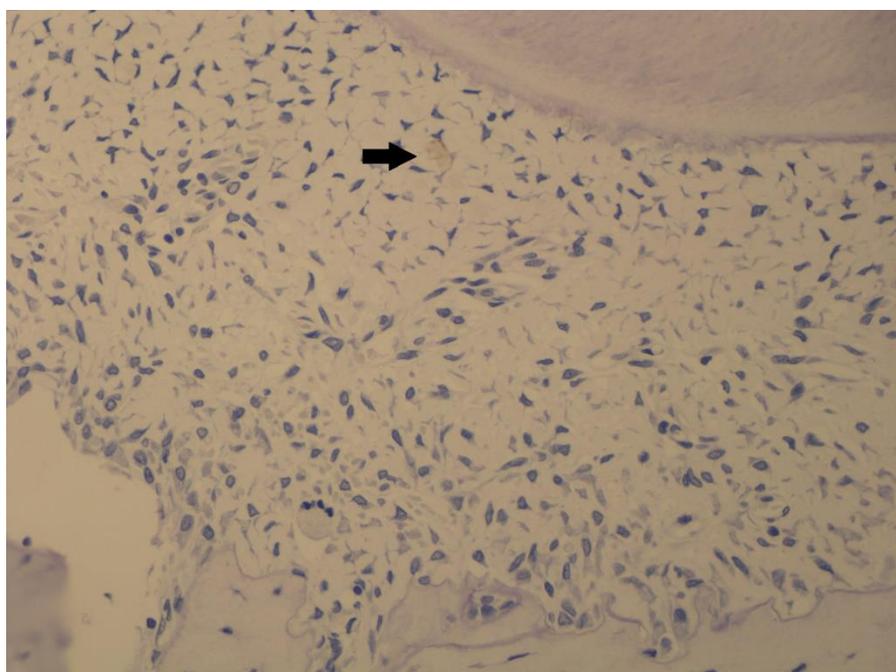
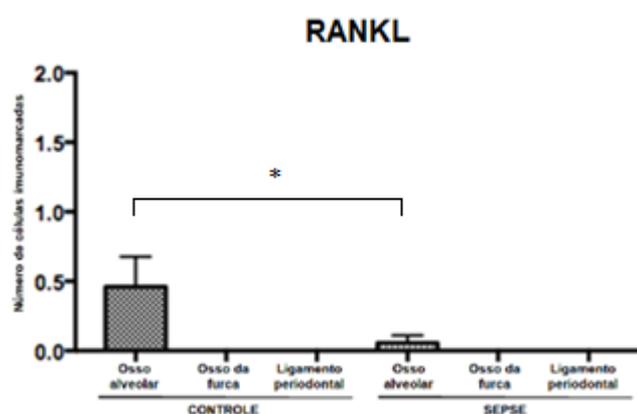
Fonte: O autor.

De acordo com a análise estatística por teste t de Student a um nível de significância de 95% ($\alpha=0,05$), não houve diferença significativa entre os dois grupos estudados ($p > 0,05$) para nenhuma das regiões analisadas.

5.2.2 Marcação imunohistoquímica para RANKL

Os dois grupos de animais tiveram os cortes histológicos das hemimandíbulas imunomarcados para RANKL e avaliados em cinco campos distintos nas regiões do ligamento periodontal, osso alveolar e área da furca, observando-se os seguintes resultados:

GRÁFICO 9 - Imunomarcção para RANKL nas regiões do ligamento periodontal, osso alveolar e osso da furca dos grupos controle e sepse.



Cortes histológicos das hemimandíbulas provenientes de ratos sépticos e não-sépticos foram analisados em relação ao número de células marcadas para RANKL (→) através de reações de imunohistoquímica. Os resultados representam valores da média e desvio-padrão para cada um dos grupos analisados.

* Teste t de Student $p < 0,05$ na região de osso alveolar. (n=6)

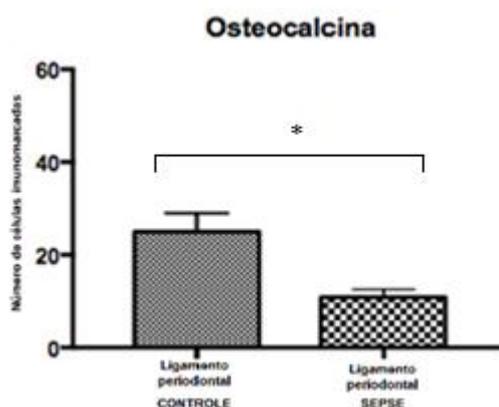
Fonte: O autor.

De acordo com a análise estatística por teste t de Student a um nível de significância de 95% ($\alpha=0,05$), houve diferença significativa entre os dois grupos estudados ($p<0,05$) para a região de osso alveolar.

5.2.3 Marcação imunohistoquímica para osteocalcina

Os dois grupos de animais tiveram os cortes histológicos das hemimandíbulas imunomarcados para osteocalcina e avaliados em cinco campos distintos nas regiões do ligamento periodontal, osso alveolar e área da furca, observando-se os seguintes resultados:

GRÁFICO 10 - Imunomarcação para osteocalcina na região do ligamento periodontal dos grupos controle e sepse.



Cortes histológicos das hemimandíbulas provenientes de ratos sépticos e não-sépticos foram analisados em relação ao número de células marcadas para OC (\rightarrow) através de reações de imunohistoquímica. Os resultados representam valores da média e desvio-padrão para cada um dos grupos analisados.

Os resultados representam valores da média e desvio-padrão para cada um dos grupos analisados.

* Teste t de Student $p < 0,05$ na região de ligamento periodontal. (n=6)

Fonte: O autor.

Quanto às marcações no osso alveolar e de furca, não foram realizadas contagens referentes ao número de células imunomarcadas, uma vez que a matriz óssea se mostrou marcada de forma mais homogênea. De acordo com a análise estatística por teste t de Student a um nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$), houve diferença significativa entre os dois grupos estudados ($p < 0,05$) para a região do ligamento periodontal, com aumento significativo no número de células imunomarcadas para osteocalcina no grupo controle.

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos relatam que condições sistêmicas de saúde parecem exercer influência sobre as doenças periodontais (CLAUDINO et al., 2007; LUNDBERG et al., 2010; AL-KATMA et al., 2007; LIRA-JUNIOR; FIGUEREDO, 2016; LI et al., 2014), podendo intervir na saúde como um todo (ANBINDER et al., 2016), o que sugere a condição de comorbidade, onde uma via imunopatogenética funciona de forma similar em distúrbios distintos (SOMERS et al., 2006).

Nesta perspectiva, a sepse trata-se de uma resposta imune e inflamatória do hospedeiro desregulada frente a uma infecção. Esta resposta suscita uma disfunção orgânica, resultando em risco de morte para o indivíduo (SHANKAR-HARI et al., 2016), sendo que os efeitos da sepse sobre o metabolismo ósseo permanecem parcialmente elucidados. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a possível influência da sepse no ligamento periodontal e no tecido ósseo do processo alveolar e da área de furca por meio de análise histológica e imunohistoquímica.

Neste estudo, a indução de sepse foi realizada pelo procedimento CLP, onde há exposição predominante de bactérias aeróbias e anaeróbias Gram-negativas. Apesar de ainda haver uma limitação de informações sobre sepses causadas por bactérias Gram-positivas ou por fungos (RITTIRSCH; HOESEL; WARD, 2007), o modelo CLP é largamente utilizado para indução de sepse em modelos animais roedores, uma vez que mimetiza de forma bem aproximada as condições reais de um paciente séptico (RITTIRSCH et al., 2009). Este modelo é utilizado principalmente para estudos de mecanismos fisiopatológicos de maneira avançada (DEMIR et al., 2016).

Os resultados encontrados revelaram ausência de diferenças histológicas significativas entre os grupos controle e sepse no osso alveolar, no osso da área de furca e no ligamento periodontal. Contudo, houve uma discreta tendência a aumento na densidade de volume das células inflamatórias nas regiões ósseas dos animais submetidos à indução de sepse. Além disto, as análises por imunohistoquímica também não revelaram distinção significativa com relação ao número de células imunomarcadas para BMP-2/4. Entretanto, houve um aumento significativo no número de células imunomarcadas para OC na região de ligamento periodontal do grupo controle e para RANKL nas regiões de osso alveolar do mesmo grupo. O que sugere

que a sepse, neste primeiro momento, pode ser capaz de alterar a expressão de importantes mediadores do metabolismo ósseo na região periodontal.

Corroborando com nossos resultados, no mesmo período das primeiras 24 horas após a indução de sepse pelo modelo CLP em ratos, outros autores relataram a presença de achados histopatológicos em outros sistemas considerados vitais, como o sistema respiratório. Análises histológicas demonstraram maior infiltração neutrofílica e edema intersticial nos pulmões dos ratos do grupo sepse. Além disso, em amostras de soro e de tecido pulmonar, foram observados índices mais elevados de IL-6, TNF- α e marcadores de estresse oxidativo em animais com sepse induzida e relação ao grupo controle (DEMIR et al., 2016). Da mesma forma, outros pesquisadores também relataram a presença de alterações histológicas no tecido pulmonar de ratos em apenas 2 horas após o procedimento CLP (GILL; ROHAN; MEHTA, 2015).

Além destes achados, foi detectado aumento nos índices séricos de IL-1 e TNF- α em ratos após 24 horas da indução de sepse pelo modelo CLP e a análise histológica do tecido hepático revelou a presença de infiltrado inflamatório, alargamento de sinusóides e áreas de necrose (ARSLAN et al., 2016). Observa-se ainda, injúria renal pós-sepse que já foi bem caracterizada, onde, após indução da síndrome por método CLP, os animais foram acompanhados por 22 dias. Os sobreviventes da sepse que passaram por uma injúria renal programada, obtiveram uma lesão tubular mais grave do que o grupo controle (PORTELLA et al., 2013). Estes dados ilustram de forma bastante representativa a condição da sepse experimental afetando de forma irreversível um órgão distante do ponto de infecção inicial (DEMIR et al., 2016; XU et al., 2013).

De fato, a ausência de alterações histológicas significativas nesse experimento pode estar correlacionada com o tempo de evolução da sepse nos animais deste trabalho, em vista do desfecho ter sido avaliado na região do periodonto. Diversos estudos que associam condições sistêmicas a alterações teciduais localizadas neste mesmo microambiente de interesse utilizaram períodos experimentais mais prolongados (CLAUDINO et al., 2015; LIU et al., 2015; DAI et al., 2016). Contudo, a realização de estudos desta natureza implica em um número maior de animais, já que a indução da sepse pelo modelo CLP em ratos apresenta taxa de sobrevivência de apenas 33% após 7 dias (YOSHIKAWA, 2012).

Esta necessidade está ilustrada nos dados obtidos por imunohistoquímica, os quais revelaram diferenças entre o número de células imunomarcadas para OC no ligamento periodontal e RANKL na região de osso alveolar. Por tratar-se de um fator para diferenciação e ativação de osteoclastos, RANKL é uma proteína considerada marcadora e mediadora da reabsorção óssea. Seu valor sérico já foi correlacionado com osteopenia tanto local quanto sistêmica (STOLINA et al., 2005) e diversos estudos demonstram sua ação perante a osteoclastogênese (IRIE; NOVINCE; DARVEAU, 2014; KATO et al., 2015; CHOI et al., 2017; CHOO et al., 2017). Assim, seria possível que um aumento na expressão de RANKL nos animais pudesse modular a integridade da estrutura óssea, tendendo a uma maior reabsorção. De fato, alguns autores já relataram aumento na reabsorção óssea em pacientes durante a fase aguda da sepse, com persistência desta condição por períodos prolongados (SMITH et al., 2002). Ainda neste sentido, foi demonstrado aumento na expressão de genes envolvidos na via de diferenciação de osteoclastos em pacientes com choque séptico (MUKHOPADHYAY et al., 2017). Sendo assim, seria necessária uma análise mais prolongada dos efeitos da sepse nos ratos após o procedimento CLP para entender se esta situação se estenderia para os animais afetados.

E ainda, a inibição da expressão de osteocalcina parece fornecer uma importante contribuição para a perda óssea alveolar (PACIOS et al., 2015). Na presente pesquisa, a marcação para osteocalcina no osso alveolar e da área de furca ocorreu de maneira homogênea e, portanto, não foram consideradas quanto ao número de células imunomarcadas. Isto se deve ao fato de que a osteocalcina é a mais abundante proteína não-colágena presente na matriz óssea, sendo, desta maneira, observada de forma mais substancial (SASAKI et al., 2013), diferentemente das marcações para BMP-2/4 e RANKL, que são visualizadas de forma mais pontual (ZORICIC et al., 2003; MORAES et al., 2011). Além disso, essa marcação foi observada, em intensidade semelhante, tanto no grupo experimental como no grupo controle em nossos experimentos.

Contudo, a expressão de osteocalcina demonstrou um aumento significativo no grupo controle na região do ligamento periodontal e este resultado pode estar relacionado ao seu importante papel na mineralização, estando, desta maneira, inversamente associada a presença de marcadores inflamatórios que contribuem para a reabsorção óssea (NEVE; CORRADO; CANTATORE, 2013).

Os mecanismos fisiopatológicos da sepse indicam que há uma resposta pró-inflamatória imediata (SCHULTE; BERNHAGEN; BUCALA, 2013; MACHADO et al., 2014). Desta forma, tem sido demonstrado que a sepse exacerba a expressão de mediadores pró-inflamatórios (JONG; VAN DER POLL; WIERSINGA, 2010) e o efeito das alterações destes mediadores em relação ao metabolismo ósseo vem sendo amplamente discutido e demonstra impacto deletério sobre diferentes sistemas biológicos (REDLICH; SMOLEN, 2012; STRAUB; CUTOLO; PACIFICI, 2015), como nos casos do sistema renal (ZARBOCK; GOMEZ; KELLUM, 2014), cardíaco (KAKIHANA et al., 2016) e neurológico (IACOBONE et al., 2009). Efetivamente, a indução de sepse resulta em aumento na expressão de mediadores inflamatórios e na formação de NO (ZHANG et al., 2016). De forma mais específica, já foi demonstrado que a indução de sepse em ratos resultou em expressão elevada e persistente de IL-6, IL-1 β e TNF- α (RESTAGNO et al., 2016; PENG et al., 2017), associada a redução na expressão de OC e CBFA-1 (YANG et al., 2014).

Sendo assim, é possível observar que a sepse exerce relevantes efeitos sobre diferentes sistemas, os quais parecem estar diretamente relacionados com o aumento na expressão de mediadores pró-inflamatórios (RESTAGNO et al., 2016; PENG et al., 2017, JONG; VAN DER POLL; WIERSINGA, 2010). Desta forma, estudos envolvendo o modelo de sepse apresentam extrema relevância, uma vez que esta é a principal causa de morte em pacientes internados em UTIs (JUNIOR; SILVA, 2014). Portanto, outros estudos devem ser realizados abordando amostragens maiores e períodos experimentais mais abrangentes, visando elucidar os outros aspectos dos mecanismos envolvidos nesta condição. Estes dados preliminares certamente contribuirão para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e tratamento mais efetivas no contexto da sepse.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que:

- A presença e a intensidade do processo inflamatório na crista óssea alveolar, no tecido ósseo da área de furca e no ligamento periodontal de ratos por meio de análise histomorfométrica, após a indução de sepse, não demonstrou nenhuma diferença estatisticamente significativa quando comparadas ao grupo controle. Contudo, houve uma discreta tendência, nas regiões de osso alveolar e furca, a um aumento na densidade de volume das células inflamatórias no grupo sepse;
- Houve diferença significativa no número de células imunomarcadas para OC na região do ligamento periodontal do grupo controle e para RANKL em osso alveolar do mesmo grupo. Entretanto, não houve diferença significativa no número de células imunomarcadas para BMP-2/4 entre os animais do grupo controle e experimental;
- Outros estudos no âmbito da homeostase do metabolismo ósseo são ainda necessários para a melhor elucidação e caracterização das alterações que ocorrem em virtude da presença da sepse no organismo e, para tanto, talvez sejam necessários períodos de análise mais tardios, que ampliem a visão dos efeitos transcorridos nas primeiras 24 horas.

REFERÊNCIAS

- AKCALI, A. et al. Periodontal diseases and stress: a brief review. **J Oral Rehabil.**, v. 40, n. 1, p. 60-8, 2013.
- ALAEI, F. et al. Evaluation of osteogenic cell differentiation in response to bone morphogenetic protein or demineralized bone matrix in a critical sized defect model using GFP reporter mice. **J Orthop Res**, v. 32, n. 9, p. 1120-8, 2014.
- ALBUQUERQUE, C. et al. A case-control study between interleukin-10 gene variants and periodontal disease in dogs. **Gene**, v. 539, p. 75-81, 2014.
- AL-KATMA, M. K. Control of periodontal infection reduces the severity of active rheumatoid arthritis. **J Clin Rheumatol.**, v. 13, n. 3, p. 134-7, 2007.
- ANBINDER, A. L. et al. Periodontal disease exacerbates systemic ovariectomy-induced bone loss in mice. **Bone**, v. 83, p. 241-247, 2016.
- ANTONUCCI, E. et al. Myocardial depression in sepsis: from pathogenesis to clinical manifestations and treatment. **J Crit Care**, v. 29, n. 4, p. 500-11, 2014.
- ARAÚJO, V. M. A.; MELO, I. M.; LIMA, V. Relationship between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Review of the Literature. **Mediators Inflamm.**, v. 2015, 2015.
- ARMITAGE, G. C. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. **Periodontology** 2000, v. 34, p. 9-21, 2004.
- ARSLAN, M. S. et al. Effects of Ecballium Elaterium on Proinflammatory Cytokines in a Rat Model of Sepsis. **J Invest Surg**, v. 29, n. 6, p. 399-404, 2016.
- BABAYIGIT, H. et al. Protective effect of beta-glucan on lung injury after cecal ligation and puncture in rats. **Intensive Care Med**, v. 31, n. 6, p. 865-70, 2005.
- BARBATO, L. et al. Periodontitis and bone metabolism. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 12, n. 2, p. 174-177, 2015.
- BATAILLE, C. et al. Different sympathetic pathways control the metabolism of distinct bone envelopes. **Bone**, v. 50, p. 1162-1172, 2012.
- BENEDETTO, A. D. et al. Periodontal Disease: Linking the Primary Inflammation to Bone Loss. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- BELLIDO, T. et al. Regulation of Interleukin-6, Osteoclastogenesis, and Bone Mass by Androgens. The Role of the Androgen Receptor. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p. 2886-2895, 1995.
- BENJAMIM, C. F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 34, p. 18-26, 2001.
- BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v. 101, p. 1644-1655, 1992.
- BORRELL, L. N.; PAPAPANOU, P. N. Analytical epidemiology of periodontitis. **J Clin Periodontol**, v.32, n. 6. p. 132-158, 2005.
- BRADAN, Z. et al. Periodontitis as a risk factor for systemic disease: Are microparticles the missing link?. **Medical Hypotheses**, v. 84, p. 555-556, 2015.

- BROWN, K. A. et al. Targeting cytokines as a treatment for patients with sepsis: A lost cause or a strategy still worthy of pursuit?. **International Immunopharmacology**, v. 36, p. 291–299, 2016.
- CASTILLO, D. M. et al. Detection of specific periodontal microorganisms from bacteraemia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. **J Clin Periodontol**, v. 38, p. 418–427, 2011.
- CAO, J. J. et al. Aging increases stromal/osteoblastic cell-induced osteoclastogenesis and alters the osteoclast precursor pool in the mouse. **J Bone Miner Res**, v. 20, n. 9, p. 1659-1668, 2005.
- CASANOVA, L.; HUGHES, F. J.; PRESHAW, P. M. Diabetes and periodontal disease: a two-way relationship. **British dental journal**, v. 217, n. 8, 2014.
- CHEN, X.; TIAN, H. M.; YU, X. J. Bone delivers its energy information to fat and islets through osteocalcin. **Orthop Surg.**, v. 4, n. 2, p. 114-117, 2012.
- CHOI, J. H. et al. Safflower bud inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation and prevents bone loss in ovariectomized mice. **Phytomedicine**, v. 15, n. 34, p. 6-13, 2017.
- CHOO, Y. Y. et al. Sappanone A inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in BMMs and prevents inflammation-mediated bone loss. **Int Immunopharmacol**, v. 22, n. 52, p. 230-237, 2017.
- CLAUDINO, M. et al. Alloxan-Induced Diabetes Triggers the Development of Periodontal Disease in Rats. **PLoS ONE**, v. 2, n. 12, 2007.
- CLAUDINO, M. et al. Diabetes triggers the loss of tooth structure associated to radiographical and histological dental changes and its evolution to progressive pulp and periapical lesions in rats. **Archives of Oral Biology**, v. 60, p. 1690-1698, 2015.
- CLAUDINO, M. et al. Spontaneous Periodontitis Development in Diabetic Rats Involves an Unrestricted Expression of Inflammatory Cytokines and Tissue Destructive Factors in the Absence of Major Changes in Commensal Oral Microbiota. **Exp Diabetes Res.**, v. 2012, 2012.
- CRONIN, A. J.; CLAFFEY, N.; STASSEN, L. F. Who is at risk? Periodontal disease risk analysis made accessible for the general dental practitioner. **British Dental Journal**, v. 205, p. 131-137, 2008.
- CROTTI, T. N. et al. Osteoimmunology: Major and Costimulatory Pathway Expression Associated with Chronic Inflammatory Induced Bone Loss. **J Immunol Res.**, v. 2015, p. 281-287, 2015.
- CULLINAN, M. P; SEYMOUR, G. J. Periodontal disease and systemic illness: will the evidence ever be enough?. **Periodontology 2000**, v. 62, p. 271–286, 2013.
- DAI, J. et al. Initial changes in alveolar bone volume for sham-operated and ovariectomized rats in ligature-induced experimental periodontitis. **Clin Oral Investig**, v. 20, n. 3, p. 581-8, 2016.
- D'AMELIO, P. et al. Bone and bone marrow pro-osteoclastogenic cytokines are up-regulated in osteoporosis fragility fractures. **Osteoporos Int.**, v.22, n. 11, p. 2869-77, 2011.
- DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock: 2012. **Surviving Sepsis Campaign**, v. 41, n. 2, p. 580-637, 2013.
- DEMIR, M. et al. Histopathological and Biochemical Effects of Ecballium elaterium on Sepsis-Induced Lung Injury. **J Invest Surg**, v. 29, n. 5, p. 302-8, 2016.
- DEUSTCHMAN, C. S.; TRACEY, K. J. Sepsis: Current Dogma and New Perspectives. **Immunity**, v. 40, n. 4, p. 463-75, 2014.
- DIOS, B. et al. Protocolo informático de manejo integral de la sepsis. Descripción de un sistema de identificación precoz. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. 2017.

- DUCY, P. et al. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. **Nature**, v. 382, n. 6590, p. 448-452, 1996.
- ELFEKY, S. et al. The epidemiologic characteristics, temporal trends, predictors of death, and discharge disposition in patients with a diagnosis of sepsis: A cross-sectional retrospective cohort study. **Journal of Critical Care**, v. 39, p. 48–55, 2017.
- ERBS, G. C. et al. Comorbidities Might Condition the Recovery of Quality of Life in Survivors of Sepsis. **Journal of Intensive Care Medicine**, 2017.
- FABRI, G. M. C. et al. Doença periodontal em doenças reumáticas pediátricas. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 54, n. 4, p. 311-317, 2014.
- FAIRCHILD, K. D. et al. Vital signs and their cross-correlation in sepsis and NEC: a study of 1,065 very-low-birth-weight infants in two NICUs. **Pediatr Res**, v. 81, n. 2, p. 315-321, 2017.
- FEINSTEIN, A. R. The pre-therapeutic classification of co-morbidity in chronic disease. **J Chronic Dis**, v. 23, n. 7, p. 455-68, 1970.
- FIGUERO, E. et al. Quantification of Periodontal Pathogens in Vascular, Blood, and Subgingival Samples From Patients With Peripheral Arterial Disease or Abdominal Aortic Aneurysms. **J Periodontol**, v. 85, n. 9, p. 1182-1193, 2014.
- FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 15, n. 423, p. 356-61, 2003.
- FRANCO, C. et al. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Periodontal Inflammation. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 2, 2017.
- GARCIA-LÒPEZ, L. et al. Impact of the implementation of a Sepsis Code hospital protocol in antibiotic prescription and clinical outcomes in an intensive care unit. **Medicina Intensiva**, 2017.
- GARLET, G. P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **J Dent Res**, v. 89, n. 12, p. 1349-63, 2010.
- GARLET, G. P. et al. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v. 31, n. 8, p. 671-9, 2004.
- GENCO, R. J.; BORGNACKE, W. S. Risk factors for periodontal Disease. **Periodontology 2000**, v. 62, p. 59–94, 2013.
- GILL, S. E.; ROHAN, M.; MEHTA, S. Role of pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis in murine sepsis-induced lung injury in vivo. **Respiratory Research**, v. 16, n. 109, 2015.
- HAJISHENGALLIS, G. Complement and periodontitis. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 1992–2001, 2010.
- HAN, Y. et al. Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. **PNAS**, v. 101, n. 47, p. 16689–16694, 2004.
- HAUSCHKA, P. V.; WIANS, F. H. J. Osteocalcin–hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. **Anatomical Record**, v. 224, p. 180–188, 1989.
- HEITZ-MAYFIELD, L. J. A. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 6, p. 196–209, 2005.
- HERZBERG, M. C.; MEYER, M. W. Effects of oral flora on platelets: possible consequences in cardiovascular disease. **J Periodontol**, v. 67, n. 10, p. 1138-42, 1996.

- HINKELBEIN, J. et al. Proteome and metabolome alterations in heart and liver indicate compromised energy production during sepsis. **Protein Pept Lett**, v. 17, n. 1, p. 18-31, 2010.
- HOCKER, S. E.; WIJDICKS, E. F. Neurologic complications of sepsis. **Continuum (Minneapolis)**, v. 20, p. 598-613, 2014.
- HOLLANDER, J. M.; MECHANICK, J. I. Bisphosphonates and metabolic bone disease in the ICU. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 12, n. 2, p. 190-5, 2009.
- HOLT, P. G. Immune and inflammatory function in cigarette smokers. **Thorax**, v. 42, p. 241-9, 1987.
- HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem**, v. 29, n. 4, p. 577-80, 1981.
- HUANG, Z. et al. Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability. **Cytokine**, v. 51, n. 3, p. 305-10, 2010.
- IACOBONE, E. et al. Sepsis-associated encephalopathy and its differential diagnosis. **Crit Care Med**, v. 37, n. 10, p. 331-336, 2009.
- ILAS. RELATÓRIO NACIONAL - PROTOCOLOS GERENCIADOS DE SEPSE: Sepsis grave e choque séptico. São Paulo. 2005–2015. Disponível em <<http://www.ilas.org.br/assets/arquivos/relatorio-nacional/relatorio-nacional.pdf>>.
- IRIE, K.; NOVINCENCO, C. M.; DARVEAU, R. P. Impact of the Oral Commensal Flora on Alveolar Bone Homeostasis. **J Dent Res**, v. 93, n. 8, p. 801-6, 2014.
- ISHIMI, Y. et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. **J Immunol**, v. 145, p. 3297-3303, 1990.
- ISSA, M. J. P. et al. Morphogenetic protein rhBMP- 2 and new bone formation. **Int. J. Morphol.**, v. 24, n. 3, p. 323-330, 2006.
- JAVED, F.; AHMED, H. B.; ROMANOS, G. E. Association between environmental tobacco smoke and periodontal disease: A systematic review. **Environmental Research**, v. 133, p. 117–122, 2014.
- JONG, H. K.; VAN DER POLL, T.; WIERSINGA, W. J. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. **J Innate Immun**, v. 2, n. 5, p. 422-30, 2010.
- JUNIOR, L. C. M. C.; SILVA, R. R. Sepsis em pacientes com traumatismo craniocéfálico em unidade de terapia intensiva: fatores relacionados à maior mortalidade. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 26, n. 2, p. 148-154, 2014.
- KAKIHANA, Y. et al. Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. **J Intensive Care**, v. 4, n. 22, 2016.
- KATO, G. et al. The inhibitory effects of a RANKL-binding peptide on articular and periarticular bone loss in a murine model of collagen-induced arthritis: a bone histomorphometric study. **Arthritis Res Ther**, v. 17, n. 251, p. 1-15, 2015.
- KELLER, A. et al. The Association Between Periodontal Disease and Overweight and Obesity: A Systematic Review. **J Periodontol.**, v. 86, n. 6, p. 766-76, 2015.
- KENZAKA, T. et al. Importance of vital signs to the early diagnosis and severity of sepsis: association between vital signs and sequential organ failure assessment score in patients with sepsis. **Intern Med**, v. 51, n. 8, p. 871-6, 2012.
- KIERSZENBAUM, A. L. Tecidos conjuntivos. In: KIERSZENBAUM, AL, **Histologia e Biologia celular**. 2. ed. Rio de Janeiro: RJ, Elsevier, 2008. P. 133-144.

- KING, G. L. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. **J Periodontol**, v. 79, n. 8, p. 1527-34, 2008.
- KOCH, A. et al. Relevance of serum sclerostin concentrations in critically ill patients. **Journal of Critical Care**, v. 37, p. 38-44, 2017.
- KUMAGAI, Y.; AKIRA, S. Identification and functions of pattern-recognition Receptors. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, p. 985-92, 2010.
- KUMAR, G. et al. Nationwide Trends of Severe Sepsis in the 21st Century (2000-2007). **CHEST**, v. 140, n. 5, p. 1223–1231, 2011.
- LACEY, D. L. et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**, v. 93, n. 2, p. 165-176, 1998.
- LAGES, E. G. P. et al. Alcohol Consumption and Periodontitis: Quantification of Periodontal Pathogens and Cytokines. **J Periodontol.**, v. 86, n. 9, p. 1058-68, 2015.
- LAKOMKIN, N. et al. Incidence and predictive risk factors of postoperative sepsis in orthopedic trauma patients. **J Orthop Traumatol**, v. 18, n. 2, p. 151–158, 2017.
- LAUPLAND, K. B.; NIVEN, D. J. The Normal Abnormal Vital Sign of Sepsis. **Crit Care Med**, v. 45, n. 4, p. 747-748, 2017.
- LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Intensive Care Med**, v. 29, p. 530–538, 2003.
- LI, C. et al. Periodontal therapy for the management of cardiovascular disease in patients with chronic periodontitis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 8, 2014.
- LIM, L. P. et al. Relationship between markers of metabolic control and inflammation on severity of periodontal disease in patients with diabetes mellitus. **J Clin Periodontol**, v. 34, p. 118–123, 2007.
- LINGQING, G. et al. Inhibition of TNF- α sepsis of lipopolysaccharide induction using nano cerium oxide system. **Materials Science and Engineering**, 2017.
- LIRA-JUNIOR, R.; FIGUEREDO, C. M. Periodontal and inflammatory bowel diseases: Is there evidence of complex pathogenic interactions?. **World J Gastroenterol.**, v. 22, n. 35, p. 7963-72, 2016.
- LISTGARTEN, M. A. The structure of dental plaque. **Periodontol 2000**, v. 5, p. 52-65, 1994.
- LIU, Z. et al. Effects of estrogen deficiency on microstructural changes in rat alveolar bone proper and periodontal ligament. **Molecular medicine reports**, v. 12, p. 3508-3514, 2015.
- LOE, H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 16, n. 1, p. 329-34, 1993.
- LUNDBERG, K. et al. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. **Nat Rev Rheumatol**, v. 6, n. 20, p. 727-30, 2010.
- MACEDO, R. et al. Heart and systemic effects of statin pretreatment in a rat model of abdominal sepsis. Assessment by Tc99m-sestamibi biodistribution. **Acta Cir Bras**, v. 30, n. 6, p. 388-93, 2015.
- MACHADO, J. R. et al. Neonatal sepsis and inflammatory mediators. **Mediators Inflamm**, v. 2014, 2014.
- MATEEN, S. et al. Level of inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: Correlation with 25-hydroxy vitamin D and reactive oxygen species. **PLoS One**, v. 12, n. 6, 2017.

MCGRAW, W. et al. Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from porphyromonas gingivalis, peptidylarginine deiminase. **Infect Immun**, v. 67, p. 3248–3256, 1999.

MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais de Henry**. 21. ed. Barueri, SP: Manole, 2012.1638 p.

MORAES, M. et al. Comparative immunohistochemical expression of RANK, RANKL and OPG in radicular and dentigerous cysts. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 11, p. 1256-1563, 2011.

MUKHOPADHYAY, S. et al. Transcriptomic meta-analysis reveals up-regulation of gene expression functional in osteoclast differentiation in human septic shock. **PLoS One**, v. 12, n. 2, 2017.

NAGPAL, R.; YAMASHIRO, Y.; IZUMI, Y. The Two-Way Association of Periodontal Infection with Systemic Disorders: An Overview. **Mediators Inflamm**, v. 2015, 2015.

NAIR, S.P. et al. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 7, p. 2371-2380, 1996.

NAKAJIMA, M. et al. Oral Administration of P. gingivalis Induces Dysbiosis of Gut Microbiota and Impaired Barrier Function Leading to Dissemination of Enterobacteria to the Liver. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, 2015.

NEMEC, A. et al. Periodontal disease, periodontal treatment and systemic nitric oxide in dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 94, p. 542–544, 2013.

NEVE, A.; CORRADO, A.; CANTATORE, F. P. Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. **J Cell Physiol**, v. 228, n. 6, p. 1149-53, 2013.

NEWMAN, M. G. et al. **Carranza, Periodontia clínica**. 11. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2011. 1328 p.

NIERMAN, D. M.; MECHANICK, J. I. Bone hyperresorption is prevalent in chronically critically ill patients. **Chest**, v. 114, n. 4, p. 1122-8, 1998.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e Dor. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

OPPERMANN, R. V. An overview of the epidemiology of periodontal diseases in Latin America. **Braz Oral Res**, v. 21, p. 8-15, 2007.

PACIOS, S. et al. Osteoblast Lineage Cells Play an Essential Role in Periodontal Bone Loss Through Activation of Nuclear Factor-Kappa B. **Sci Rep**, v. 5, p. 1-12, 2015.

PAGE, R. C. et al. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontol 2000**, v. 14, p. 216-48, 1997.

PALMA, P. V.; LEITE, I. C. G. Epidemiology and social inequalities of periodontal disease in Brazil. **Front Public Health**, v. 2, n. 203, 2014.

PALMER, R. M. et al. Mechanisms of action of environmental factors – tobacco smoking. **J Clin Periodontol**, v.32, n. 6, p. 180–195, 2005.

PARK, J. B. et al. Association between alcohol consumption and periodontal disease: the 2008 to 2010 Korea National Health and Nutrition Examination Survey. **J Periodontol**, v. 85, p. 1521-1528, 2014.

PEDRO, T. C. S.; MORCILLO, A. M.; BARACAT, E. C. E. Etiologia e fatores prognósticos da sepse em crianças e adolescentes admitidos em terapia intensiva. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 27, n. 3, p. 240-246, 2015.

- PENG, S. et al. PPAR- γ Activation Prevents Septic Cardiac Dysfunction via Inhibition of Apoptosis and Necroptosis. **Oxid Med Cell Longev**, 2017.
- PERLSTEIN, M. I.; BISSADA, N. F. Influence of obesity and hypertension on the severity of periodontitis in rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 43, p. 707-719, 1977.
- PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet**, v. 19, p. 1809–1820, 2005.
- PINTO, B. B. et al. Characterization of Brain–Heart Interactions in a Rodent Model of Sepsis. **Molecular Neurobiology**, v. 53, p. 1-8, 2016.
- PORTELLA, V. G. et al. Sepsis-Surviving Mice Are More Susceptible to a Secondary Kidney Insult. **Crit Care Med**, v. 41, p. 1056–1068, 2013.
- PRESCOTT, H. C. et al. Increased 1-Year Healthcare Use in Survivors of Severe Sepsis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 190, n. 1, p. 62–69, 2014.
- PRESHAW, P. M. et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. **Diabetologia**, v. 55, n. 1, p. 21-31, 2012.
- QIN, Y. J. et al. Cardioprotective effect of erythropoietin on sepsis-induced myocardial injury in rats. **World J Emerg Med**, v. 4, n. 3, p. 215-22, 2013.
- QUEIROZ-JUNIOR, C. M. et al. Experimental arthritis exacerbates *Aggregatibacter actinomycetem-comitans*-induced periodontitis in mice. **J Clin Periodontol**, v. 39, n. 7, p. 608-16, 2012.
- REDLICH, K.; SMOLEN, J. S. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. **Nat Rev Drug Discov**, v. 11, n. 3, p. 234-50, 2012.
- REIKERAS, O. et al. Lipopolysaccharide impairs fracture healing. An experimental study in rats. **Acta Orthopaedica**, v. 76, n. 6, p. 749–753, 2005.
- REMICK, D. G. et al. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. **Shock**, v. 13, n. 2, p. 110-6, 2000.
- RESTAGNO, D. et al. Mice Survival and Plasmatic Cytokine Secretion in a "Two Hit" Model of Sepsis Depend on Intratracheal *Pseudomonas Aeruginosa* Bacterial Load. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. 1-19, 2016.
- RIBEIRO, F. V. et al. Resveratrol Inhibits Periodontitis-Related Bone Loss in Rats Submitted to Cigarette Smoke Inhalation. **J Periodontol.**, v. 11, p. 1-16, 2017.
- RITTIRSCH, D.; HOESEL, L. M.; WARD, P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, p. 137-146, 2007.
- RITTIRSCH, D. et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nat Protoc**, v. 4, n. 1, p. 31–36, 2009.
- SANTIAGO, M. B. et al. Neurohypophyseal response to fluid resuscitation with hypertonic saline during septic shock in rats. **Exp Physiol.**, v. 98, p. 556-563, 2013.
- SASAKI, M. et al. Altered distribution of bone matrix proteins and defective bone mineralization in *klotho*-deficient mice. **Bone**, v. 57, n. 1, p. 206-219, 2013.
- SCHETT, G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. **Eur J Clin Invest.**, v. 41, n. 12, p. 1361-6, 2011.

- SCHULTE, W.; BERNHAGEN, J.; BUCALA, R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. **Mediators Inflamm**, v. 2013, 2013.
- SHANKAR-HARI, M. et al. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 775–787, 2016.
- SHAW, A. T.; GRAVALLESE, E. M. Mediators of inflammation and bone remodeling in rheumatic disease. **Semin Cell Dev Biol**, v. 49, p. 2-10, 2016.
- SMITH, L. M. et al. Increased bone resorption in the critically ill: Association with sepsis and increased nitric oxide production. **Crit Care Med**, v. 30, p. 837–840, 2002.
- SOMERS, E. C. et al. Autoimmune diseases co-occurring within individuals and within families: a systematic review. **Epidemiology**, v. 17, n. 2, p. 202-17, 2006.
- SOUZA, J. A. et al. Modulation of host cell signaling pathways as a therapeutic approach in periodontal disease. **J Appl Oral Sci**, v. 20, n. 2, p. 128-38, 2012.
- SPAPEN, H. Liver perfusion in sepsis, septic shock, and multiorgan failure. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 291, n. 6, p. 714–720, 2008.
- STEARNS-KUROSAWA, D. J. et al. The Pathogenesis of Sepsis. **Annu Rev Pathol**, v. 6, p. 19–48, 2011.
- STOLINA, M. et al. RANKL is a marker and mediator of local and systemic bone loss in two rat models of inflammatory arthritis. **J Bone Miner Res**, v. 20, n. 10, p. 1756-65, 2005.
- STRAUB, R. H.; CUTOLO, M.; PACIFICI, R. Evolutionary medicine and bone loss in chronic inflammatory diseases--A theory of inflammation-related osteopenia. **Semin Arthritis Rheum**, v. 45, n. 2, p. 220-8, 2015.
- SUDA, K. et al. Suppression of Osteoprotegerin Expression by Prostaglandin E2 Is Crucially Involved in Lipopolysaccharide-Induced Osteoclast Formation. **J Immunol**, v. 172, p. 2504-2510, 2004.
- TANAKA, Y.; NAKAYAMADA, S.; OKADA, Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, n. 3, p. 325-8, 2005.
- TRAVIS, J. On the Origin of The Immune System. **SCIENCE**, v. 324, 2009.
- VARGAS, D. M.; AUDI, L.; CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 4, p. 367-70, 1997.
- VAVRICKA, S. R. et al. Periodontitis and gingivitis in inflammatory bowel disease: a case-control study. **Inflamm Bowel Dis.**, v. 19, n. 13, p. 2768-77, 2013.
- VIEIRA, J. G. H. Considerações Sobre os Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo e sua Utilidade Prática. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 43, n. 3, p. 415-422, 1999.
- WICHTERMANN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock - A review of laboratory models and a proposal. **Journal of Surgical Research**, v. 29, n. 2, p. 189-201, 1980.
- WIERSINGA, W. J. Current insights in sepsis: from pathogenesis to new treatment targets. **Current Opinion in Critical Care**, v. 17, p. 480–486. 2011.
- XIE, G. H. et al. Defensins and Sepsis. **Biomed Res Int.**, v. 2014, 5 p., 2014.
- XU, L. et al. Effects of adiponectin on acute lung injury in cecal ligation and puncture-induced sepsis rats. **Journal of surgical research**, v. 183, p. 752-759, 2013.

YANG, J. et al. Gene expression patterns in bone following Lipopolysaccharide stimulation. **Cellular & molecular biology letters**, v. 19, p. 611-622, 2014.

YASEMIN, C. et al. Resistance mechanisms. **Ann Transl Med**, v. 4, n. 17, p. 1-8, 2016.

YENDE, S.; IWASHYNA, T. J.; ANGUS, D. C. Interplay between sepsis and chronic health. **Trends Mol Med**, v. 20, n. 4, p. 234-8, 2014.

YOSHIKAWA, T. et al. High-dose immunoglobulin preparations improve survival in a CLP-induced rat model of sepsis. **Langenbecks Arch Surg**, v. 397, p. 457-465, 2012.

ZARBOCK, A.; GOMEZ, H.; KELLUM, J. A. Sepsis-induced acute kidney injury revisited: pathophysiology, prevention and future therapies. **Curr Opin Crit Care**, v. 20, n. 6, p. 588-95, 2014.

ZHANG, F. et al. Neutrophil Dysfunction in Sepsis. **Chin Med J (Engl)**, v. 129, n. 22, p. 2741-2744, 2016.

ZOFKOVA, I. Bone Tissue as a Systemic Endocrine Regulator. **Physiol. Res.**, v. 64, p. 439-445, 2015.

ZORICIC, S. et al. Expression of bone morphogenetic proteins and cartilage-derived morphogenetic proteins during osteophyte formation in humans. **J Anat.**, v. 202, p. 269-277, 2003.

ZOU, W.; BAR-SHAVIT, Z. Dual Modulation of Osteoclast Differentiation by Lipopolysaccharide. **Journal of bone and mineral research**, v. 17, n. 7, 2002.

**ANEXO 1 – Certificado da Comissão de Ética na Utilização de Animais da
Universidade Federal de Uberlândia**



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Patofisiologia do tecido pulmonar em processo de sepse experimental em ratos”, protocolo nº 045/15, sob a responsabilidade de Robinson Sabino da Silva – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de 04/09/2015.

(We certify that the project entitled " Patofisiologia do tecido pulmonar em processo de sepse experimental em ratos ", protocol 045/15, under the responsibility of Robinson Sabino da Silva - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of 04/09/2015).

Vigência do Projeto	Início: 10/09/2015 - Término: 10/09/2017
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Ratos Wistar
Número de animais	120
Peso / Idade	250 g – 1,5 meses
Sexo	Machos
Origem / Local	Biotério
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 17 de setembro de 2015.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

**ANEXO 2 - Certificado da Comissão de Ética na Utilização de Animais da
Universidade Estadual de Ponta Grossa**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA**

CERTIFICADO

Certifico para os devidos fins que a aluna de pós-graduação Gabriela Veloso Vieira da Silva Pinheiro e sua orientadora Marcela Claudino da Silva responsáveis pelo projeto de mestrado intitulado: Análise histológica do osso alveolar em mandíbulas de ratos com sepse induzida estão dispensadas de uma carta de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA desta instituição uma vez que a utilização dos animais do referido projeto já foi autorizada pela CEUA-UFUB sobre o título de: Patofisiologia do tecido pulmonar em processo de sepse experimental em ratos.

Protocolo: 045/15

Ponta Grossa, 03 de abril de 2017

Prof. Dra. Dionízia Xavier Scomparin
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG