

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E
SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

STEFANY PEDROTTI

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA PERIODONTITE
EXPERIMENTAL SOBRE OS TECIDOS PERIODONTAIS E
DA REGIÃO PENIANA DE RATOS**

CASCAVEL-PR
(Fevereiro/2015)

STEFANY PEDROTTI

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA PERIODONTITE
EXPERIMENTAL SOBRE OS TECIDOS PERIODONTAIS E
DA REGIÃO PENINANA DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Processo saúde-doença

ORIENTADOR: Dr. Carlos Augusto Nassar

COORIENTADORA: Dra. Célia Cristina Leme
Beu

CASCAVEL-PR

(Fevereiro/2015)

FOLHA DE APROVAÇÃO

STEFANY PEDROTTI

**INFLUÊNCIA DA PERIODONTITE SOBRE A DISFUNÇÃO
ERÉTIL**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Nassar
UNIOESTE

Prof. Dra. Rose Meire Costa Brancalhão
UNIOESTE

Prof. Dr. Fábio André dos Santos
UEPG

CASCAVEL-PR
(Fevereiro/2015)

*“Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento
debaixo do céu: tempo de plantar e tempo de arrancar o que se
plantou.” Eclesiastes 3, 1-2. Iluminada por essa passagem
bíblica, dedico este trabalho Àquele que me guiou e ajudou a
plantar esta semente: Meu Senhor e Meu Deus.*

AGRADECIMENTOS

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.” Charles Chaplin. Quero agradecer de coração, a todas as pessoas que participaram desta jornada.

A Deus por me abençoar e permitir que eu ingressasse no mestrado, por me amparar nos momentos difíceis e me dar força interior para superar as dificuldades. Agradeço também a Nossa Senhora Aparecida por ter intercedido ao Pai e proporcionado uma graça especial a minha família durante esta trajetória.

Aos meus queridos pais, Jordano e Lucineide, por confiarem em mim, por me proporcionarem a oportunidade de continuar estudando, pelo amor incondicional, pela paciência em saber ouvir nos momentos de incerteza, pelas palavras de incentivo e por me mostrarem os verdadeiros valores da vida. Minha gratidão e amor eterno a vocês.

Ao meu irmão, Gregory, por ser este exemplo de amor e cristão comprometido. Obrigada, maninho, por sempre me apoiar, pelas sábias palavras de conforto nos momentos de angústias, pela parceria, inclusive para ir comigo na universidade no Natal, por me ajudar em todas as horas que eu pedia e por você existir, afinal minha vida não teria o mesmo sentido sem você. Amo-te.

A minha vó Lúcia e tio Sérgio pelo carinho e por terem acolhido a nossa família temporariamente em sua casa. Obrigada, vizinha por todas as orações que sempre fez a mim, até mesmo para que desse tudo certo com meus experimentos. Eu te amo e te admiro muito.

A minha titia, Lucinéia, por ser essa segunda mãe e melhor amiga, a qual posso contar para desabafar minhas inquietações da vida, compartilhando dos mais diversos sentimentos sempre com muito humor e pensamento positivo. Obrigada pelas risadas que amenizavam as preocupações diárias e pelo carinho e cuidado que sempre tem comigo.

Ao professor, Carlos Augusto Nassar, por ter acreditado em mim e me concedido a oportunidade de desenvolver esse trabalho, por ser exemplo de profissional eficiente e humano, por me incentivar e me fazer acreditar que tudo daria certo, além de todo auxílio e paciência dispensados durante esse período. Agradeço muito a Deus por ter tido um orientador como você. A minha gratidão e admiração.

À professora, Célia Cristina Leme Beu, pela coorientação, pela disponibilidade e disposição em me ensinar, auxiliar e ajudar para a concretização deste projeto. Sua participação foi essencial neste trabalho. A você meu respeito e gratidão.

A todos os Professores que foram membros da banca examinadora que enfrentei durante esse curso: Dra. Maria Lúcia Bonfleur, Dra. Beatriz Rosana Gonçalves de Oliveira Toso, Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro, Dra. Rose Meire Costa Brancalhão. Suas sábias recomendações a respeito desta pesquisa, sem dúvida, engrandeceram esse trabalho.

Às professoras, Rose Meire Costa Brancalhão e Lucinéia de Fátima Chasko, por me receberem e permitir a realização de parte desta pesquisa no laboratório de Biologia Celular e por sempre estarem à disposição, respondendo minhas dúvidas e me mostrando o caminho da ciência. Agradeço também a técnica deste laboratório, Celeste da Rocha Paiva, pela assistência técnica na realização deste estudo e puxões de orelha para que fizéssemos tudo de forma correta.

À professora, Patrícia Oehlmeyer Nassar, por toda ajuda durante o sacrifício dos ratos, por nos ensinar a fazer o ELISA e por toda dedicação e atenção. Agradeço também a professora, Sara Sagae, pela disponibilidade e ajuda fundamental na gravação do comportamento sexual dos ratos.

Ao corpo docente do Mestrado em Biociências e Saúde da Unioeste, pela contribuição direta com a minha formação. Agradeço também à Graselha, pela paciência em atender a todos os meus telefonemas e questionamentos.

Aos professores, Fábio André dos Santos e Rose Meire Costa Brancalhão, que aceitaram compor minha banca de defesa.

A todas as pessoas do laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo pela ajuda nos cuidados com os ratos do biotério, especialmente a Ana Claudia Paiva Alegre Maller por ter nos ajudado a fazer as análises do ELISA com tanto carinho e paciência.

A Karine Figueredo da Costa e a Viviane Pontillo pela ajuda imprescindível durante a realização desta pesquisa, por toda parceria, dedicação e apoio. Muito obrigada!

A Regina Kunz e Marilucia Santorum pela simpatia, amizade, amor com as pessoas e por toda ajuda proporcionada durante o desenvolvimento dos experimentos.

A minha amiga em Cristo, Gabriela Moreira Soares, pela amizade durante estes dois anos e por ter me dado a alegria de tê-la como uma irmã cursilhista. Muito obrigada pela paciência, por nunca medir esforços para me ajudar, pela atenção, apoio e conselhos. Desejo que sua vida seja eternamente DECOLORES.

À querida, Francielly Andressa Felipetti, por ter reservado um final de semana, mesmo com todos os seus compromissos, para nos ensinar a extrair proteína. Eu te admiro muito e agradeço de coração pelas conversas que sempre me fizeram acreditar ainda mais nos desígnios de Deus e pela acolhida quando fui a Piracicaba.

A Paula Bernardon e Renata Delgado pela amizade formada ao longo deste mestrado. Muito obrigada por toda ajuda, especialmente à Renatinha que se dispôs a nos ensinar e ficar comigo até altas horas analisando as lâminas no laboratório de Patologia. Serei eternamente grata a ti e certamente vocês deixaram suas marcas em minha vida.

Aos amigos do programa de pós-graduação, Ademar Dantas Cunha Jr., por ser um exemplo de pessoa humana, e aos queridos, Jeferson Freitas Toregeani e Poliana de Fátima Biederman pelo companheirismo, aprendizado ao longo desta etapa e por me proporcionarem muitos momentos de risadas, especialmente com o espirro das “três” durante as aulas de bioestatística.

A minha amiga cursilista, Izabela de Carvalho e ao meu primo Mikhael Cima Chrum pela ajuda concedida no término deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

Enfim, a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho meu sincero e imenso agradecimento. Muito obrigada!

RESUMO GERAL

A doença periodontal caracteriza-se por ser uma infecção crônica, a qual pode causar uma inflamação sistêmica devido aos elevados níveis de citocinas inflamatórias envolvidas, tal como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e interleucina-18 (IL-18), o que contribui para o desenvolvimento da disfunção endotelial em diferentes órgãos. O comprometimento da função endotelial pode levar à disfunção erétil, pois a mesma é caracterizada por alterações vasculares, como oclusão das artérias cavernosas por aterosclerose e redução da reatividade vascular devido à diminuição da liberação do óxido nítrico. Nesse sentido, a inflamação associada com a doença periodontal pode danificar as camadas endoteliais penianas, induzindo à ocorrência da ereção disfuncional. Contudo, o papel potencial da periodontite crônica na fisiopatologia da disfunção erétil permanece escasso. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a morfologia tecidual do periodonto e pênis de ratos associados ou não com a periodontite induzida experimentalmente. Para isso, foram obtidos 18 ratos *Wistar* e induzida a doença periodontal em 9 ratos, sendo que os 9 ratos restantes serviram como controle. Aos 30 dias de indução da doença periodontal, foi gravado o comportamento sexual dos ratos e após, os animais foram sacrificados para a obtenção de amostra gengival, hemimandíbula e pênis para as análises morfológicas, morfométricas, imunológicas e radiográficas. Os resultados mostraram que a periodontite experimental contribuiu para a redução do comportamento sexual dos ratos ($p < 0.05$), bem como causou perda óssea alveolar, com significativa atividade osteoclástica e aumento de volume gengival ($p < 0.05$). Além disso, o grupo com periodontite apresentou uma maior concentração de citocinas inflamatórias, tal como IL-6 nas gengivas e TNF- α no pênis ($p < 0.05$). Não houve diferença estatisticamente significativa nas dimensões ventral-dorsal e látero-lateral do pênis ($p > 0.05$), no entanto verificou-se uma maior espessura e menor área estatisticamente significativa da artéria dorsal do pênis no grupo com periodontite experimental, assim como uma menor área dos espaços vasculares dos corpos cavernosos ($p < 0.05$). Com base nesses resultados, conclui-se que a periodontite experimental provocou alterações estruturais e funcionais no pênis de ratos *Wistar*, bem como alterações de comportamento sexual, portanto a inflamação sistêmica causada pela doença periodontal pode ser um importante fator de risco para a disfunção erétil, por isso se faz necessário o desenvolvimento de intervenções envolvendo vários profissionais da saúde para prevenção e tratamento dessas duas patologias que comprometem a saúde e bem-estar geral dos indivíduos.

Palavras-chaves: periodontite; disfunção erétil; disfunção endotelial.

GENERAL ABSTRACT

Periodontal disease is characterized by a chronic infection, which may cause systemic inflammation due to high levels of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-18 (IL-18), contributing to the development of endothelial dysfunction in various organs. The impairment of endothelial function can lead to erectile dysfunction, because it is characterized by vascular changes such as occlusion of cavernous arteries by atherosclerosis and reduction vascular reactivity due to decreased release of nitric oxide. In this sense, inflammation associated with periodontal disease may damage the penile endothelial layer, leading to occurrence of erectile dysfunction. However, the potential role of chronic periodontitis in the pathophysiology of erectile dysfunction remains scarce. Therefore, the aim of the study was to evaluate the tissue morphology of periodontal and penis rats associated or not with experimentally induced periodontitis. For this, 18 Wistar rats were obtained and induced periodontal disease in 9 rats, whereas the remaining 9 rats served as controls. After 30 days of induction of periodontal disease, the sexual behavior of rats was recorded and later, the animals were sacrificed to obtain gingival sample, hemimandible and penis to the morphological analysis, morphometric, immunological and radiographic. The results showed that experimental periodontitis contributed to the reduction in the sexual behavior of rats ($p < 0.05$) and caused alveolar bone loss with a significant increase in osteoclastic activity and gingival volume ($p < 0.05$). Moreover, the group with periodontitis had a higher concentration of inflammatory cytokines such as IL-6 in the gingiva and TNF- α in the penis ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference in ventral-dorsal and side-to-side distance of the penis ($p > 0.05$), however there was a higher thickness and a shorter area statistically significant of penile dorsal artery in the group with experimental periodontitis, as well as a smaller area of vascular spaces of the penile cavernous tissue ($p < 0.05$). Based on these results, it is concluded that the experimental periodontitis caused structural and functional changes in the penis Wistar rats and sexual behavior changes, therefore systemic inflammation caused by periodontal disease can be an important risk factor for erectile dysfunction, that is why is necessary the development of interventions involving many health professionals for prevention and treatment of these two diseases that endanger the health and general well-being of individuals.

Keywords: periodontitis; dysfunction erectile; dysfunction endothelial.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	14
1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. REVISAO GERAL DE LITERATURA	19
2.1 Disfunção erétil	19
2.2 Doença periodontal	20
2.3 Doença aterosclerótica	22
2.4 Disfunção endotelial	24
2.5 Inter-relação entre doença periodontal e doença aterosclerótica	25
2.6 Inter-relação entre doença aterosclerótica e disfunção erétil	28
2.7 Inter-relação entre doença periodontal e disfunção erétil	32
3. REFERÊNCIAS	36
4. ARTIGO CIENTÍFICO 1	48
4.1 ANEXO A: Normas da revista científica	61
5. ARTIGO CIENTÍFICO 2	67
5.1 ANEXO B: Normas da revista científica	82
ANEXO C: Aprovação pelo Comitê de Ética	89

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Esquema da gengiva marginal do rato, mostrando os pontos de referência usados para as medidas morfométricas do epitélio bucal, crista epitelial e tecido conjuntivo.

Figura 2 Fotomicrografia representativa da organização geral e da análise das dimensões, em secção transversal, de pênis de rato.

Figura 3.A Fotomicrografia representativa de secção sagital do primeiro molar mandibular direito de um animal do grupo controle.

Figura 3.B Fotomicrografia representativa de secção sagital do primeiro molar mandibular direito de um animal do grupo experimental.

Figura 4 Fotomicrografia representativa das evidências de reabsorção óssea do osso alveolar mandibular que circunda o primeiro molar direito de um rato do grupo experimental.

Figura 5.A Fotomicrografia representativa de secção transversal de pênis de um animal do grupo controle.

Figura 5.B Fotomicrografia representativa de secção transversal de pênis de um animal do grupo experimental.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 (artigo científico 1) Effect of the induction of periodontal disease in the frequency of the behaviors of sniffing the anogenital region; mounting movements; the latencies (s) of penile insertion in the presence of a sexually receptive female (R); ejaculation and the overall duration of general movement.

TABELA 1 (artigo científico 2) Análise histomorfométrica da gengiva da hemimandíbula direita dos ratos dos grupos estabelecidos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em mm.

TABELA 2 Análise histomorfométrica da hemimandíbula direita dos ratos dos grupos estabelecidos para quantificação de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em unidades.

TABELA 3 Análise histomorfométrica do primeiro molar inferior direito dos ratos e análise radiográfica do lado mesial do primeiro molar inferior esquerdo dos ratos da distância junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do grupo controle e experimental. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em mm para a análise histomorfométrica e em pixels para a análise radiográfica.

TABELA 4 Análise das concentrações da citocina IL-6 nas amostras gengivais e da citocina TNF- α nas amostras de pênis dos ratos no grupo controle e experimental. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em pg/ml.

TABELA 5 Valores das dimensões ventral-dorsal e látero-lateral de secções transversais do pênis, da espessura da parede e área da artéria dorsal do pênis e da área dos espaços vasculares dos corpos cavernosos. Os valores representam média \pm desvio

padrão e estão expressos em mm para dimensões ventral-dorsal e látero-lateral de secções transversais do pênis e da espessura da parede e em mm² para área da artéria dorsal do pênis e área dos espaços vasculares dos corpos cavernosos, respectivamente.

LISTA DE ABREVIATURAS

A: artéria dorsal do pênis

ADMA: dimetilarginina assimétrica

Alb: túnica albugínea

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CC: corpo cavernoso

CE: corpo esponjoso

CEEAAP: Comitê de Ética em Experimentação Animal e Aulas Práticas

CO: crista óssea alveolar

COL: colesterol

CON: controle

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPE: células progenitoras endoteliais

DAC: doença arterial coronariana

DAP: doença arterial periférica

DCV: doenças cardiovasculares

DE: disfunção erétil

DPC: doença periodontal crônica

E: espaço vascular

EJ: epitélio juncional

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Acoplado a Enzimas

eNOS: enzima óxido nítrico sintetase endotelial

EO: epitélio oral

ES: epitélio sulcular

E-Selectina: selectina endotelial

ET-1: endotelina-1

g: grama

GMPc: guanosina monofostato cíclico

GTP: guanosina trifosfato
HDL: lipoproteína de alta densidade
HE: hematoxilina e eosina
HIV: vírus da imunodeficiência humana
Hz: hertz
ICAM: molécula de adesão intercelular
IDL: lipoproteína de densidade intermediária
IL-1: interleucina-1
IL-18: interleucina-18
IL-1 β : interleucina-1beta
IL-4: interleucina-4
IL-6: interleucina-6
IL-8: interleucina-8
JCE: junção cimento-esmalte
LDL: lipoproteínas de baixa densidade
LIG: ligadura
LL: dimensão látero-lateral
LP: ligamento periodontal
LPS: lipopolissacarídeos
mA: miliAmpére
ml: mililitro
mm: milímetro
ms: milisegundo
NANC: nervo não adrenérgico não colinérgico
NE: norepinefrina
nNOS: enzima óxido nítrico sintetase neuronal
NO: óxido nítrico
NOS: enzima óxido nítrico sintetase
OC: osteoclasto
PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
PCR: proteína "C" reativa
PGE 2: prostaglandina "E" 2
PMNs: polimorfonucleares
s: segundo

T: trabéculas

TC: tecido conjuntivo

TCA: ácido tricloroacético

TG: triglicerídeos

TNFR1: fator de necrose tumoral alfa receptor-1

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

tPA: ativador do plasminogênio tecidual

UNIOESTE: Universidade Estadual do Oeste do Paraná

VCAM: molécula de adesão de células vasculares

VD: dimensão ventral-dorsal

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

Vp: valor máximo da tensão

vWF: fator de Von Willebrand

μm : micrômetro

1. INTRODUÇÃO GERAL

A saúde é compreendida como um fenômeno multidimensional que envolve aspectos físicos, psicológicos e sociais (SOUZA; OLIVEIRA, 1998), cuja complexidade requer uma abordagem interdisciplinar nas áreas da ciência da saúde, inclusive na Odontologia. Dessa forma, o profissional do século XXI precisa possuir um perfil generalista, capaz de reconhecer a relação das doenças bucais com quadros sistêmicos (KRIGER, 2005).

Um ramo emergente na Periodontia, definido como *Periodontia Médica*, tem se consolidado na literatura ao longo da última década, uma vez que há inúmeros trabalhos científicos apontando para uma forte associação entre a saúde periodontal e sistêmica, segundo a qual as doenças periodontais podem influenciar negativamente a salubridade geral das pessoas, tanto quanto diversas patologias gerais podem afetar o início e a progressão das doenças periodontais, ou mesmo fazer parte do quadro de manifestações bucais de uma doença sistêmica (GULATI et al., 2013).

A doença periodontal caracteriza-se por ser uma resposta inflamatória nos tecidos periodontais, frequentemente assintomática, provocada por microrganismos presentes na placa bacteriana. A manifestação clínica da doença depende da natureza dessa resposta (FORD; GAMONAL; SEYMOUR, 2010). A gengivite é a forma mais suave, sendo que não afeta as estruturas de suporte subjacentes dos dentes e é reversível. Já a periodontite resulta na perda de tecido conjuntivo e de suporte do osso devido à ação dos produtos tóxicos liberados na área subgengival por periodontopatógenos específicos, como também em razão da resposta inflamatória desencadeada pela presença desses microrganismos (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005).

Muitos estudos têm relatado que a periodontite crônica pode desencadear doenças sistêmicas vasculares, como coronariana, cerebrovascular e pulmonar obstrutiva crônica, por meio da indução de disfunção endotelial (BOBETSIS; BARROS; OFFENBACHER, 2006; CHANG et al., 2010) devido ao estado de inflamação sistêmica, como evidenciado pela elevada concentração no plasma de citocinas pró-inflamatórias (BUHLIN et al., 2009; FEDELE et al., 2011; HIGASHI et al., 2009; LEIVADAROS et al., 2005).

Ao longo das últimas décadas se tem dado muita atenção a essa possível associação entre a doença periodontal e a coronariana aterosclerótica, haja vista que, como a periodontite é uma doença inflamatória, ela pode desempenhar um papel importante na patogênese da aterosclerose e suas complicações (BECK, 2001; HANSSON, 1999). Assim, ambas as enfermidades estão correlacionadas, pois compartilham de uma natureza inflamatória comum e representam uma condição crônica.

Dessa forma, é razoável inferir que a inflamação sistêmica induzida por patógenos periodontais pode estar associada com a disfunção endotelial e aterosclerose primeiro nos pequenos vasos, como o vascular do pênis, e mais tarde em artérias maiores, tais como as coronárias (ZADIK et al., 2009).

Logo, podemos sugerir que existe também uma associação entre a doença periodontal e a disfunção erétil, conforme Peng, Zhng (2009), os quais sugeriram que a doença periodontal pode induzir a disfunção erétil porque contribui para o distúrbio endotelial.

Dada essa possível relação causal entre doença periodontal e disfunção erétil, é necessária a realização de mais estudos, uma vez que ainda existe escassez na literatura no que diz respeito aos mecanismos de interação entre essas duas doenças, motivo pelo qual se justificou a realização desta pesquisa. Portanto, com vistas a preencher lacunas no conhecimento, o presente estudo buscou resolver o seguinte problema: qual a possível influência da doença periodontal sobre o aparecimento da disfunção erétil?

A partir desse problema surge a hipótese de que os mediadores inflamatórios, tais como o TNF- α e IL-6, que estão elevados em pacientes com doença periodontal, podem induzir uma variedade de alterações estruturais e funcionais em células endoteliais e conseqüentemente estarem associados a um risco aumentado de disfunção endotelial (ALI et al., 2011; EATON et al., 2007; VLACHOPOULOS et al., 2006), desempenhando um papel crucial na ocorrência da disfunção erétil.

2. REVISÃO GERAL DE LITERATURA

2.1 Disfunção Erétil

A disfunção erétil (DE) é definida, segundo a Conferência de Consenso em Impotência, como a incapacidade persistente em obter ou manter uma ereção peniana suficiente para a realização da atividade sexual satisfatória. A DE é o problema sexual mais comum no gênero masculino, sendo que a sua incidência aumenta com a idade e afeta mais de um terço dos homens ao longo de suas vidas (HEIDEBAUGH, 2010). Caracteriza-se como a doença sexual mais prevalente quando comparada aos distúrbios ejaculatórios e de desejo, estimando-se 140 milhões de casos no mundo, com projeções de 300 milhões para o ano de 2025 (AYTA; MCKINLAY; KRANE, 1999). A disfunção é uma condição multifatorial e sua causa pode ser neurológica, endócrina, psicogênica, farmacogênica ou vascular, sendo que esta última é a forma mais comum de problemas de ereção e está diretamente associada ao estilo de vida (KENDIRCI; NOWFAR; HELLSTROM, 2005). Essa doença provoca um impacto negativo substancial sobre os relacionamentos íntimos, qualidade de vida e autoestima, comprometendo assim o bem-estar físico, psicológico e social (HEIDEBAUGH, 2010).

Diversos mecanismos podem estar envolvidos na ereção peniana, a qual é determinada por mudanças de pressão nos seios cavernosos. A vascularização do pênis difere da maioria dos leitos vasculares, uma vez que este é composto por arteríolas e seios ociosos cheios de sangue, revestidos com músculo liso e células endoteliais. Na ausência de estímulos de excitação, a vasoconstrição cavernosa mantém o pênis no estado não ereto. A contração do músculo liso cavernoso, principalmente em resposta à norepinefrina (NE) liberada das terminações nervosas simpáticas, estreita o lúmen arteriolar e as cavidades sinusoidais, restringindo o fluxo de sangue para manter baixa pressão intracavernosa e um pênis sem ereção (flácido). Durante a excitação sexual ou tumescência noturna, ocorre a liberação de óxido nítrico (NO), predominantemente por meio da ativação da enzima óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) nos nervos não adrenérgico não colinérgico (NANC) e da enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) nas células endoteliais locais. O NO estimula a enzima guanilato ciclase que, em seguida, converte o GTP em GMPc, induzindo um aumento substancial deste dentro da célula, o que causa o

relaxamento do músculo liso, e resulta na dilatação das arteríolas e dos seios cavernosos. Ocorre, assim, um aumento do fluxo sanguíneo (impulsionado pela força da pressão arterial média) e um subsequente aumento da pressão intracavernosa. A resposta erétil, devido à pressão elevada, expande a túnica albugínea, resultando no aumento do comprimento e diâmetro do pênis, característico da ereção (ANDERSSON, 2001; ANDERSSON; STIEF, 1997; BURNETT, 1995).

Já são bem conhecidos os fatores de risco mais comumente correlacionados à disfunção erétil. Hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, doença coronária, tabagismo, consumo excessivo de álcool, obesidade, doenças prostáticas, depressão, idade avançada, fatores socioeconômicos, tais como baixa renda, baixo grau de escolaridade e desemprego têm sido associados à presença de dificuldades de ereção. Portanto, a disfunção erétil pode indicar a existência de doenças subjacentes, sobretudo aquelas relacionadas ao sistema cardiovascular (HEIDEBAUGH, 2010).

2.2 Doença Periodontal

Outra doença que compartilha alguns dos fatores de risco da disfunção erétil, tal como, diabetes mellitus, doença coronária, tabagismo e obesidade, é a doença periodontal, caracterizada por ser uma doença infecciosa crônica que ocasiona um processo imunoinflamatório nos tecidos que circundam o dente (periodonto), sendo este um processo interativo entre a placa bacteriana, os tecidos periodontais e os mecanismos de defesa do hospedeiro (KOLENBRANDER, 2000).

O agente etiológico desta doença é a placa bacteriana, composta principalmente por um grupo de bactérias, sendo que as espécies mais comuns são: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotellas intermédia*, *Prevotellas nigrescens*, *Streptococcus intermedius* e *Treponema* sp (CAMELO-CASTILLO et al., 2015; HAFFAJEE; SOCRANSKY, 1994; LINDHE; NIKLAUS; KARRING, 2011).

Essas bactérias colonizadoras da superfície dentária, inicialmente gram-positivas, estão dispostas sobre a forma de biofilmes microbianos. A partir do crescente acúmulo de microrganismos na placa bacteriana na margem gengival,

alterações no microambiente do biofilme possibilitam a colonização de bactérias gram-negativas. Assim, os componentes típicos desta espécie, como os lipopolissacarídeos (LPS), surgem e supostamente interagem com receptores de superfície dos queratinócitos do epitélio sulcular, atingindo o tecido conjuntivo, onde entram em contato com leucócitos, células endoteliais e fibroblastos. Clinicamente, essa fase inicial reflete alterações inflamatórias restritas ao periodonto de proteção (gengiva), caracterizadas como vermelhidão e inchaço da margem gengival, sangramento quando provocado, alterações no contorno gengival, bem como perda de adesão tecidual e aumento do fluxo do fluido gengival com o intuito de diluir e eliminar o agressor. Estabelece-se então o quadro de gengivite induzida por placa bacteriana, que não envolve perda de inserção periodontal e é reversível perante a remoção da referida placa (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 1999; ATTSTRON, 1971; HORTON; OPPENHEIN; MERGENHAGEM, 1974; LEHNER, 1974; LINDHE; NIKLAUS; KARRING, 2011).

A persistência dos biofilmes microbianos em íntima proximidade aos tecidos periodontais, possibilitando contínuo estímulo antigênico, transforma a resposta inflamatória, inicialmente aguda, na qual predominam alterações vasculo-exsudativas e degradação de colágeno, em lesão crônica, com proliferação do epitélio juncional abaixo da junção cimento-esmalte, formando uma bolsa periodontal, além de contínua destruição do colágeno, ativação de fibroblastos e fagócitos, acúmulo de células polimorfonucleares (PMNs) nos epitélios juncional e da bolsa periodontal, denso infiltrado inflamatório mononuclear, predominantemente, linfoplasmocitário, e perda de suporte dentário identificado pela reabsorção óssea alveolar. Esses eventos caracterizam o quadro de periodontite, pois as alterações inflamatórias já atingiram o periodonto de sustentação (cimento radicular, ligamento periodontal e osso alveolar). Dessa forma, a doença periodontal crônica (DPC) pode ser definida como uma doença tipicamente crônica e continuamente progressiva, que apresenta repentinos indícios de atividade (HORTON; OPPENHEIN; MERGENHAGEM, 1974; JEFFCOAT; REDDY, 1991; LINDHE; NIKLAUS; KARRING, 2011; PAGE; SCHROEDER, 1976; SOCRANSKY et al., 1984).

A destruição do periodonto pode ocorrer por ação direta dos produtos bacterianos periodontais como a hialuronidase e a colagenase ou ainda por ação indireta, na qual a degradação é mediada pelo sistema imune-inflamatório do hospedeiro. A resposta inflamatória consiste na primeira linha de defesa do

organismo contra um agente agressor (neste caso as bactérias periodontopatogênicas), podendo ser inata ou adaptativa. Tanto na resposta inata quanto na adaptativa, há participação de elementos celulares e humorais. Na defesa celular há participação dos neutrófilos, linfócitos T e B e plasmócitos, sendo que os linfócitos e PMN são os leucócitos predominantes no infiltrado no estágio da gengivite, já na lesão avançada da periodontite o tipo celular dominante é o plasmócito (BERGLUNDH; DONATI, 2005; GARANT; MULVIHILL, 1972), e na defesa humoral participam o complemento, citocinas (IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-18, TNF- α) e as imunoglobulinas (FABBRI, 2007).

2.3 Doença Aterosclerótica

As doenças cardiovasculares (DCV) são hoje um problema global e constituem uma importante causa de morte nos países desenvolvidos e também naqueles em desenvolvimento como consequência do melhor controle de doenças infecciosas, dentre elas HIV, malária, tuberculose, e devido à epidemia de obesidade e diabetes (MURRAY; LOPEZ, 1997; GERSH et al., 2010). Em geral, as manifestações clínicas das DCV, como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica, são causadas por um processo aterosclerótico e têm início a partir da meia-idade. Portanto, a patogênese mais encontrada nas DCV é a aterosclerose (LAURENTI; BUCHALLA; CARANTIN, 2000).

Os fatores de risco clássicos para a aterosclerose, segundo Saba-Chujfi, Pereira e Dias (2007), são: hipertensão arterial, hipercolesterolemia, dislipidemia, predisposição genética, obesidade, sedentarismo, tabagismo e o diabetes mellitus.

Conforme Sposito et al. (2007), a aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre. Em uma situação saudável, o revestimento da parede interna de um vaso, chamado endotélio, é intacto e liso, conseqüentemente, o fluxo sanguíneo através do vaso é normal, sendo este endotélio intacto essencial para manter a integridade do vaso e a reatividade vascular. Entretanto, inúmeros fatores, como a elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL, IDL, VLDL, remanescentes de quilomícrons), hipertensão arterial e tabagismo, podem levar à lesão do endotélio vascular e a sua disfunção, iniciando assim a formação da placa aterosclerótica. Como consequência, a disfunção

endotelial aumenta a permeabilidade da íntima às lipoproteínas plasmáticas favorecendo a retenção destas no espaço subendotelial. Retidas, as partículas de LDL sofrem oxidação, o que causa a exposição de diversos neoepítomos, tornando-as imunogênicas. O depósito de lipoproteínas na parede arterial, processo-chave no início da aterogênese, ocorre de maneira proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma.

Além do aumento da permeabilidade às lipoproteínas, outra manifestação da disfunção endotelial é o surgimento de moléculas de adesão leucocitária na superfície do endotélio, processo estimulado pela presença da LDL oxidada. As moléculas de adesão são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a parede arterial. Induzidos por proteínas quimiotáticas, os monócitos migram para o espaço subendotelial, onde se diferenciam em macrófagos, que por sua vez captam as LDL oxidadas. Os macrófagos repletos de lipídeos são chamados células espumosas e são o principal componente das estrias gordurosas, lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose. Estas células se acumulam na camada íntima do vaso formando uma lesão chamada de ateroma e, quando morrem se tornam necróticas e formam um aglomerado lipídico. Ao mesmo tempo, alguns mediadores da inflamação estimulam a migração e proliferação das células musculares lisas da camada média arterial. Estas, ao migrarem para a íntima, passam a produzir não só citocinas e fatores de crescimento, como também matriz extracelular que formará parte da capa fibrosa da placa aterosclerótica em torno do aglomerado lipídico (ALMEIDA; DIAS, 2008; SPOSITO et al., 2007).

Assim, a placa aterosclerótica plenamente desenvolvida é constituída por elementos celulares, componentes da matriz extracelular, núcleo lipídico rico em colesterol e por uma capa fibrosa rica em colágeno. Todos esses processos, desde a migração dos LDL e dos monócitos até a formação do ateroma e da capa fibrótica, levam a um aumento do tamanho da placa. Primeiramente, a parede do vaso se expande ou se remodela para acomodar a placa, evitando a invasão do lúmen, mas como a placa continua a crescer a artéria não consegue compensar, o que leva à protrusão dentro do lúmen, isto reduz o fluxo sanguíneo dentro do vaso. A consequência potencialmente fatal da aterosclerose resulta da ruptura da capa fibrosa, que expõe um material altamente trombogênico. Esse evento geralmente ocorre nas áreas mais vulneráveis da placa, iniciando uma cascata de eventos que inclui a formação de um coágulo ou trombo. Um pequeno coágulo pode

provavelmente ocluir parcialmente o vaso, mas os grandes coágulos poderão bloquear completamente o fluxo sanguíneo através dele, e isso pode levar então a um infarto do miocárdio (ALMEIDA; DIAS, 2008; SPOSITO et al., 2007).

2.4 Disfunção Endotelial

O endotélio é um regulador importante da biologia vascular, que inclui a coagulação, inflamação, modulação do crescimento e remodelação vascular. A diminuição da integridade do endotélio e da função endotelial é chamada de disfunção endotelial (GIMBRONE et al., 1995; ROSS, 1993).

A priori, a disfunção endotelial é caracterizada por alterações significativas nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos, tais como rigidez vascular, aumento do tônus vascular, produção de citocinas inflamatórias, aumento da permeabilidade, susceptibilidade à invasão de imunócitos, diminuição do crescimento das células endoteliais e a desregulação dos fatores fibrinolíticos. Segundo Aversa et al. (2010), os marcadores clínicos e bioquímicos da disfunção endotelial incluem:

- (I) redução da expressão e atividade da eNOS, da síntese de NO e aumento da produção da dimetilarginina assimétrica (ADMA), um inibidor endógeno da eNOS;
- (II) maior produção de espécies reativas de oxigênio;
- (III) aumento da síntese e liberação do peptídeo vasoconstritor de endotelina-1 (ET-1);
- (IV) ampliação da expressão de marcadores de adesão celular, tais como E-selectina (BLANKENBERG et al., 2001), moléculas de adesão intercelular (ICAM) (WITTE et al., 2003), e moléculas de adesão de células vasculares (VCAM);
- (V) desregulação dos fatores fibrinolíticos, tais como fator de Von Willebrand (vWF), o ativador do plasminogênio tecidual (tPA), e inibidor do ativador do plasminogênio do tipo 1 (PAI-1);
- (VI) incapacidade de se regenerar a partir de células progenitoras endoteliais (CPE);
- (VII) aumento da apoptose endotelial;
- (VIII) ampliação da permeabilidade celular;
- (IX) aumento da tonicidade vascular (TRAISH; ABU-ZAHRA; GUAY, 2008);

(X) maior produção de citocinas inflamatórias, como a IL-6, PCR e TNF- α .

As citocinas são secretadas por células brancas do sangue, em resposta a estímulos inflamatórios (KELSO, 1998; O'SHEA; MURRAY, 2008; TAYAL; KALRA, 2008), no entanto, sabe-se hoje que outras células e tecidos não só produzem, mas são frequentemente os principais alvos dos efeitos delas. Um destes tecidos é o endotélio vascular e há evidências de que as citocinas induzem uma variedade de alterações estruturais e funcionais em células endoteliais (muitas vezes chamado de "ativação endotelial") e que as interações entre elas e o endotélio podem desempenhar papéis importantes na imunidade, de modo a ocasionar inflamação e lesão vascular (COTRAN; POBER, 1989, 1990; ZHANG, 2008).

Além disso, as citocinas modulam a tonicidade da vasculatura em diferentes leitos vasculares (GLEMBOT; BRITT; HILL, 1996) e a resposta vascular parece estar relacionada com o equilíbrio entre todos os fatores vasoativos liberados sob a influência delas. Assim, as diferenças regionais na liberação e capacidade de resposta a estes fatores parecem contribuir para a resposta dilatadora ou constritora observada dentro de um leito vascular específico (VILA; SALAICES, 2005).

A função endotelial é prejudicada na presença do aumento de estresse oxidativo e condições inflamatórias (TREPEL; ZEIHNER; FICHTLSCHERER, 2006), pois o endotélio vascular é um importante alvo para as ações do TNF- α nas doenças em que as concentrações desta citocina no plasma estão significativamente elevadas, como, por exemplo, na periodontite. A administração de TNF- α *in vivo* induz disfunção no relaxamento dependente do endotélio em uma variedade de leitos vasculares e diminui a liberação do NO, já que o TNF- α tem a capacidade de aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio arterial, o que provavelmente contribui para a redução dos níveis de NO. Em adição aos seus efeitos sobre a função endotelial, um papel pró-aterogênico substancial para o TNF- α foi demonstrado recentemente, indicando que a presença do receptor fator de necrose tumoral receptor-1 (TNFR1) na parede vascular pode causar aterosclerose (ZHANG et al., 2007).

2.5 Inter-relação entre Doença Periodontal e Doença Aterosclerótica

A inflamação causada pela doença periodontal, geralmente, não se limita apenas aos tecidos periodontais, uma vez que bactérias e mediadores inflamatórios

podem entrar na corrente sanguínea e se disseminar, causando uma inflamação sistêmica, ou seja, apesar da natureza localizada da DPC, a infecção no sulco periodontal pode levar a respostas inflamatórias além do periodonto (LI et al., 2000).

Isto porque em um periodonto saudável, o epitélio sulcular e a ação da imunidade inata local atuam como uma barreira natural que impede a penetração das bactérias no sangue, tanto que em uma gengiva saudável apenas um pequeno número de bactérias, principalmente anaeróbias facultativas, é encontrado no sulco gengival e na corrente sanguínea (LI et al., 2000).

No entanto, na periodontite, com a inflamação e ulceração do epitélio da bolsa periodontal, este se torna vulnerável às bactérias e funciona como uma porta de entrada. Os microrganismos que ganham acesso ao sangue são normalmente eliminados pelo sistema reticuloendotelial em poucos minutos (bacteremia transitória) sem sintomas clínicos (LI et al., 2000). Porém, é plausível que as bactérias persistem em locais distantes disseminando fatores de virulência que agem como antígenos solúveis. Assim, as bactérias e os antígenos bacterianos que estão sistemicamente dispersos disparam uma inflamação sistêmica significativa. Leucócitos, células endoteliais e hepatócitos respondem aos fatores bacterianos por meio da secreção de mediadores pró-inflamatórios imunes (citocinas, quimiocinas, PCR). Com a exposição continuada, os antígenos solúveis reagem com um anticorpo específico na circulação para formar complexos imunes que amplificam a inflamação nos locais de deposição (LI et al., 2000; THODEN VAN VELZEN; ABRAHAM-INPIJN; MOORER, 1984).

Da mesma forma, os mediadores pró-inflamatórios, tais como a IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGE₂, produzidos localmente nos tecidos gengivais inflamados, podem se dissipar para a circulação e o resultado dessa disseminação tanto de bactérias quanto de mediadores inflamatórios é a promoção de um impacto sistêmico, como a indução da disfunção endotelial (AMAR et al., 2003; ELTER et al., 2006). Como discutido anteriormente, a aterosclerose ocorre em resposta à agressão endotelial, de modo que as bactérias orais podem induzir esse distúrbio endotelial por meio da invasão destas células. A liberação de produtos bacterianos para a circulação, como vesículas de membrana (BARTRUFF; YUKNA; LAYMAN, 2005) de *Porphyromonas gingivalis* ou componentes bacterianos solúveis livres de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (OSCARSSON et al., 2008), pode estimular respostas pró-aterogênicas nas células endoteliais.

Após essa lesão, as células do endotélio liberam citocinas inflamatórias locais e sistêmicas e agentes quimiotáticos, que ocasionam a expressão aumentada de moléculas de adesão na superfície endotelial. Essas alterações promovem interações com os leucócitos, dentre eles os monócitos, os quais migram para a camada íntima da artéria (BRAUNERSREUTHER; MACH; STEFFENS, 2007; WOOLLARD; GEISSMANN, 2010).

Embora a invasão do endotélio e de outras células vasculares por *Porphyromonas gingivalis* certamente representa grande parte da patologia aterosclerótica associada com a doença periodontal, há dados que indicam que a aterosclerose é uma infecção causada por múltiplas espécies. Os agentes bacterianos mais frequentemente encontrados nas placas ateroscleróticas foram: *Porphyromonas gingivalis* – 32%; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* – 4%; *Prevotella intermédia* – 20% e *Treponema denticola* – 32% (CHEN et al., 2008). As evidências que comprovam a detecção de várias espécies periodontais em ateromas começaram com os primeiros relatos da detecção de genomas bacterianos bucais dentro de placas ateroscleróticas (HARASZTHY et al., 2000 a, b). O fato de várias espécies bacterianas orais estarem associadas com a aterosclerose não é inesperado, dada a complexidade de espécies na placa bacteriana.

Além disso, os pacientes com periodontite possuem alteração nos níveis de LDL e maior absorção de lipídios (ANDERSSON; LIBBY; HANSSON, 2010); logo, há uma retenção destes no espaço subendotelial.

Dessa forma, o endotélio danificado desencadeará a agregação de plaquetas e iniciará a formação de trombos no sítio da lesão, o que pode resultar em oclusão do vaso sanguíneo (POPOVIC et al., 2012).

Portanto, os indivíduos com periodontite possuem um pior perfil cardiometabólico e, por conseguinte, um aumento do risco de doenças cardiovasculares. Estudos relatam uma melhoria nas concentrações de lipídeos no soro, após a terapia periodontal (redução no colesterol total em uns e aumento da concentração de HDL em outros) (D'AIUTO; ORLANDI; GUNSOLLEY, 2013).

Em síntese, Schenkein e Loos (2013) justificam porque indivíduos com periodontite possuem maior potencial de aterogênese ou exacerbação das lesões ateroscleróticas o que resulta em eventos cardiovasculares:

- (I) um número de mediadores inflamatórios está presente em maiores concentrações na circulação sistêmica de pacientes com periodontite do que em indivíduos saudáveis;
- (II) vários anticorpos que podem afetar as respostas inflamatórias na aterosclerose foram identificados na DPC. Em alguns casos, esses anticorpos aumentam o risco ou aceleram o desenvolvimento da aterosclerose por ampliar a inflamação endotelial, promover a absorção de lipídeos nos macrófagos ou bloquear os efeitos antiaterogênicos das moléculas de proteção;
- (III) as concentrações séricas de lipídios potencialmente inflamatórios, incluindo LDL, triglicerídeos (TG) e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), estão elevadas em pacientes com periodontite. Essas subformas lipídicas podem entrar mais facilmente na parede do vaso sanguíneo, serem mais suscetíveis à modificação e, portanto, mais suscetíveis também a se incorporar na lesão aterosclerótica. Isso acelera o desenvolvimento das lesões locais e promove a sua maturação.

Com base nas considerações acima, sugere-se que o início e a propagação das lesões ateroscleróticas aumentam em pacientes com DPC, já que a ação patogênica das bactérias que adentram o sistema circulatório juntamente com a ação das citocinas inflamatórias circulantes conduzem a uma resposta inflamatória no interior da lesão ateromatosa, levando à aterogênese.

2.6 Inter-relação entre Doença Aterosclerótica e Disfunção Erétil

O pequeno diâmetro das artérias cavernosas e o teor relativamente elevado de endotélio e músculo que reveste as artérias no pênis em comparação com outros órgãos sugerem que o leito vascular peniano pode ser um sensível indicador de doença vascular sistêmica (BILLUPS et al., 2005; MONTORSI; MONTORSI; SCHULMAN, 2003). Tanto que se tem evidenciado na literatura que há uma coocorrência de DE e doença do sistema cardiovascular. Observa-se que certos fatores de risco são comuns tanto para a DE quanto para doenças associadas à aterosclerose. Isso pode ser exemplificado com o estudo de Kaminetsky (2008), o qual notou que a ereção disfuncional era encontrada em cerca de 30% dos norte-americanos com diagnóstico de hipertensão. Da mesma forma, Lyngdorf e

Hemmingsen (2004) observaram uma correlação entre a prevalência das falhas eréticas, hipertensão arterial, dislipidemia e diabetes, assim como, Virag, Bouilly e Frydman (1985) que estudaram 440 homens com DE, descobriram que 64% eram fumantes, 30% tinham diabetes e 34% apresentavam hiperlipidemia.

As evidências anteriores sustentam-se em razão da DE vasculogênica ser uma das formas de doença veno-oclusiva. Essa insuficiência veno-oclusiva pode ocorrer devido ao envelhecimento, hipercolesterolemia e aterosclerose, o que resulta em inadequada rigidez peniana e duração da ereção (SIROKY; AZADZOI, 2003), ou seja, a hipercolesterolemia, hipertensão, tabagismo e outros fatores de risco comuns para aterosclerose promovem a doença oclusiva em vários leitos arteriais e por fim levam à DE vasculogênica (STEPHANIE et al., 2013).

Uma recente meta-análise de 740 pacientes em quatro países descobriu que tratamentos para fatores de risco cardíaco (modificações de estilo de vida e farmacoterapia) foram associados com melhorias na função sexual, indicando um processo fisiopatológico comum para a ereção disfuncional e a DCV (GUPTA et al., 2011).

A DE tem sido reconhecida como uma anormalidade orgânica e fisiológica que afeta a circulação peniana como parte de uma doença vascular generalizada (JOHANNES et al., 2000). Portanto, a função erétil prejudicada e a aterosclerose coronariana estão intimamente ligadas, pois ambas são consequências da disfunção endotelial, levando a restrições no fluxo sanguíneo (CHIURLIA et al., 2005; VLACHOPOULOS et al., 2007). Desse modo o elo fisiopatológico provável entre essas duas doenças seria a disfunção endotelial, já que esta é um fator etiológico comum de ambas (SOLOMON; MAN; JACKSON, 2003). Estudos em homens com concentrações elevadas de colesterol e DE mostram deficiência no relaxamento do músculo liso dependente do endotélio depois do distúrbio endotelial e diminuição da síntese do NO pela eNOS (BIVALACQUA et al., 2003).

O NO liberado a partir do endotélio intacto é conhecido por desempenhar um papel central na modulação do tônus microvascular e no fluxo sanguíneo regional (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Além disso, o NO inibe a migração e adesão de leucócitos, reduz a proliferação do músculo liso vascular, a agregação e adesão plaquetária e conduz, assim, à prevenção da aterosclerose. Portanto, a DE é um evento preditor e também um dos importantes fatores de risco da aterosclerose.

Os mecanismos patogênicos subjacentes da disfunção endotelial nos corpos cavernosos parecem contribuir para a diminuição da função do endotélio arterial coronária e por isso, os primeiros sinais de DE são considerados um marcador importante para uma manifestação precoce de aterosclerose e um precursor de doença vascular sistêmica (ANDERSSON, 2001; TODA; AYAJIKI; OKAMURA, 2005).

Como relatado anteriormente, a inflamação desempenha um papel patofisiológico importante na progressão da aterosclerose. Ao promover a inflamação na parede do vaso, em razão da produção de citocinas e expressão de moléculas de adesão celular, o endotélio disfuncional prepara o ambiente para a iniciação e progressão de lesões ateroscleróticas em ambas as vasculaturas, coronária e do pênis (MONTORSI et al., 2006; VLACHOPOULOS et al., 2006). A disfunção endotelial conduz também a um aumento da produção de PAI-1 (inibidor da fibrinólise) e à redução da produção do tPA componente fibrinolítico, o que contribui para um estado trombogênico (FEINBLOOM; BAUER, 2005; LERMAN; ZEIHNER, 2005). Portanto, marcadores pró-trombóticos endoteliais, incluindo fibrinogênio, vWF e PAI-1 estão em maiores concentrações em pacientes com DE (VLACHOPOULOS et al., 2006). Dado o importante papel desses mecanismos, o aumento da atividade inflamatória e pró-trombótica em pacientes com falhas eréticas, mas sem evidências clínicas de aterosclerose coronariana sugerem que a ausência de lesões ateroscleróticas coronarianas obstrutiva não impede um risco de futuros eventos coronários agudos (VLACHOPOULOS et al., 2006, 2007).

Montorsi et al. (2005), propôs a “hipótese do tamanho da artéria” como uma das principais razões da DE preceder a aterosclerose coronariana e outras doenças vasculares sintomáticas. De acordo com esta hipótese, a aterosclerose progride relativamente no mesmo ritmo em todos os principais leitos vasculares, no entanto os sintomas indicativos da doença em ramos arteriais menores irão se manifestar primeiro, uma vez que os vasos sanguíneos de maior porte podem tolerar melhor o mesmo volume de placa em desenvolvimento, ou seja, as artérias penianas, que são menores em diâmetro do que as artérias coronárias são afetadas anteriormente pelo mesmo tamanho da placa aterosclerótica, o que reduz significativamente o fluxo sanguíneo, portanto, a DE se manifesta antes dos eventos cardiovasculares. A literatura apoia as reivindicações desta hipótese, ao revelar a alta prevalência de dificuldade de ereção em pacientes com DAC e o aparecimento dos sintomas da DE

antes dos sintomas da DAC. Isso sustenta a descoberta que os homens com incapacidade de ereção raramente relatam sintomas evidentes de DAC, enquanto que aqueles com esta doença muitas vezes relatam sintomas de DE pré-existentes (KAWANISHI et al., 2001; KLONER et al., 2003; MONTORSI et al., 2006; MONTORSI; MONTORSI; SCHULMAN, 2003; VIRAG; BOUILLY; FRYDMAN, 1985).

Vale ressaltar ainda que em 2003, Montorsi; Montorsi e Schulman (2003) consultaram 300 pacientes no departamento de emergência italiano com síndromes coronarianas aguda e DE, destes um total de 71% tinham sintomas de disfunção sexual antes do aparecimento de sintomas de DAC.

Segundo Banks et al. (2013), a DE por si só provavelmente não seja uma das principais causas de DCV e deve ser considerada como um marcador de risco ao invés de um fator de risco para DCV. Isto é, provavelmente ela sirva como um indicador, ou "biomarcador", da gravidade dos processos patológicos subjacentes, tais como a disfunção endotelial e aterosclerose.

Desse modo, as evidências para apoiar que a DE é um evento preditor da aterosclerose coronariana, de acordo com Jackson et al. (2010) são:

- (i) uma proporção significativa de homens com ereção disfuncional apresentam precocemente sinais de DAC;
- (ii) homens com falhas eréticas pré-existent podem desenvolver DAC mais graves do que aqueles sem a mesma. Segundo Montorsi; Montorsi e Schulman (2003), a presença de DE está associado com DAC mais severas, como aterosclerose silenciosa, que pode ter sido desenvolvida alguns anos antes do início dos sintomas. No entanto, isso nem sempre é verdadeiro, já que muitos pacientes têm DAC grave (apresentando-se como síndromes coronárias agudas) na ausência de DE;
- (iii) o intervalo de tempo entre o início dos sintomas da DE e a ocorrência de sintomas da DAC é estimada em 2-3 anos, e de um evento cardiovascular em 3-5 anos;
- (iv) há uma patologia endotelial subjacente comum em ambas as doenças;
- (v) a incapacidade de ereção está associada com aumento da mortalidade devido a sua correlação com a DAC.

Portanto a DE, DAC e DAP são manifestações distintas de um mesmo processo de doença aterosclerótica, ou seja, a função erétil prejudicada pode ser a primeira manifestação de um dos espectros clínicos da doença que vai avançar para

incluir a DAC e a DAP numa fase posterior (KLONER et al., 2003). Logo, a DE representa um sinal de futura patologia cardiovascular que os médicos devem reconhecer e tratar de forma efetiva (MONTORSI et al., 2006; STEPHANIE et al., 2013; VIRAG; BOUILLY; FRYDMAN, 1985).

Com base nas considerações acima, podemos afirmar que a DE e a aterosclerose coronariana são doenças comuns que frequentemente coexistem e estão correlacionadas, uma vez que além de compartilhar fatores de risco comuns, elas possuem uma base fisiopatológica similar, ou seja, a disfunção endotelial.

2.7 Inter-relação entre Doença Periodontal e Disfunção Erétil

Conforme relatado anteriormente, acredita-se que a DE seja um sinal precoce da doença cardíaca coronária logo, é razoável acreditar que a inflamação sistêmica induzida por patógenos periodontais pode estar associada com a disfunção endotelial e aterosclerose primeiro nos pequenos vasos, como o vascular do pênis, e mais tarde em artérias maiores, tais como as artérias coronárias. Segundo Zadik et al. (2009), a DPC está relacionada primeiramente com a ereção disfuncional em homens jovens e mais tarde com a DAC em homens de meia-idade, ou seja, a DE e a DPC representam os dois extremos do mesmo espectro cardiovascular.

Embora vários vasodilatadores tenham sido implicados na resposta erétil, o NO parece ser o principal estimulador da vasodilatação cavernosa e ereção peniana (BURNETT et al., 1996; IGNARRO et al., 1990; RAJFER et al., 1992). O endotélio intacto geralmente libera esse potente vasodilatador que mantém a reatividade vascular. Entretanto, conforme exposto anteriormente, a concentração de NO diminui quando há lesão endotelial e, conseqüentemente, a vasculatura fica menos reativa. Logo, é razoável postular que qualquer substância que reduz os mecanismos de relaxamento ou aumenta os mecanismos contráteis das células do músculo liso cavernoso pode ser um agente causal das falhas eréticas. Nesse sentido, a citocina TNF- α aparece como o candidato mais importante para a fisiopatologia da DE, devido aos seus efeitos conhecidos sobre a vasculatura. Estudos revelam que há uma patogenia comum tanto para a incapacidade de ereção quanto para a disfunção endotelial, sendo que esta última quando presente no pênis contribui fortemente para a DE (BAUMHAKEL et al., 2006; COSTA; VIRAG, 2009;

ELESBER et al., 2006; IOAKEIMIDIS et al., 2011). Da mesma forma, Montorsi; Montorsi e Schulman (2003), assim como Kirby; Jackson e Simonsen (2005) revelaram que o mau funcionamento da ereção pode ser resultado do comprometimento da função endotelial, como também da oclusão das artérias cavernosas por aterosclerose.

A periodontite crônica pode contribuir para o desenvolvimento da disfunção endotelial, sendo que três possíveis mecanismos resumem a explicação de como isso ocorre. Primeiramente, a inflamação crônica está associada a um aumento de espécies reativas de oxigênio (DIJHORST-OEI et al., 1999; HIGASHI et al., 2002). O excesso de produção destas espécies conduz a um aumento da inativação de NO, e os danos no sistema antioxidante podem contribuir para a disfunção endotelial em pacientes com periodontite (HIGASHI et al., 2008). Em segundo lugar, as concentrações elevadas de mediadores inflamatórios tais como o TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-18 podem estar associadas com um risco maior de disfunção endotelial (EATON et al., 2007; VLACHOPOULOS et al., 2006), sendo que as concentrações destes marcadores inflamatórios também estão aumentadas em pacientes com DPC (ALI et al., 2011). Por último, patógenos periodontais ou seus produtos podem afetar diretamente a função endotelial (FORNER et al., 2006). Portanto, a DPC pode ser considerada um fator de risco de ereção disfuncional, uma vez que a disfunção endotelial é um evento-chave na fisiopatologia da DE, que é considerada uma manifestação clínica precoce da doença vascular generalizada.

Vários trabalhos publicados na literatura corroboram com o exposto acima, demonstrando que existe uma relação entre a DPC e DE (ELTAS et al., 2013; KELLER; CHUNG; LIN, 2012; MATSUMOTO et al., 2014; OGUZ et al., 2013; SHARMA; PRADEEP; RAJU, 2011; ZADIK et al., 2009; ZUO et al., 2011). Entre eles, temos o estudo de Zuo et al. (2011) em um modelo de rato, no qual se relatou que a diminuição na expressão da eNOS e da atividade da NOS no tecido cavernoso do pênis causada pelo estado inflamatório sistêmico em periodontite pode ser um dos fatores de risco importantes da DE. Os resultados desse estudo também mostraram que as concentrações de TNF- α em ratos com periodontite foram significativamente maiores do que no grupo controle. Um dos papéis do TNF- α inclui a inibição da expressão de eNOS em células endoteliais.

Embora as camadas vasculares penianas, responsáveis pela ereção do pênis, estejam longe da fonte de inflamação em indivíduos que sofrem de

periodontite, o endotélio está em contato direto com o sangue circulante e ainda pode sofrer de estresse oxidativo sistêmico. Além disso, mesmo que somente baixas concentrações de citocinas inflamatórias induzidas pela periodontite e pelo estresse oxidativo possam atingir o endotélio peniano, o prognóstico da disfunção endotelial é cumulativo (CERIELLO et al., 2002) e pode ir ao encontro da natureza crônica da periodontite. Por isso, a perda da integridade funcional do endotélio e o subsequente distúrbio endotelial desempenham um papel crucial na ocorrência da DE (AVERSA et al., 2010).

Os resultados do estudo realizado por Oguz et al. (2013) reforçam a ideia de que a DPC está presente com mais frequência em pacientes com falhas eréticas do que naqueles que não a apresentam. Além disso, o maior nível de sangramento à sondagem visto no grupo com DE em comparação com o grupo controle e a correlação entre sangramento à sondagem e anormalidade erétil apoia os relatos anteriores de que um alto nível de infecção resulta em DE devido ao distúrbio endotelial. Da mesma forma, Matsumoto et. al. (2014) também concluíram que há uma correlação estatisticamente significativa entre a DPC e a presença de DE e os mesmos autores sugeriram que a DE está associada com os danos causados pela disfunção endotelial e alterações inflamatórias associadas com a DPC.

Coincidentemente, Zadik et al. (2009) relataram que a periodontite crônica foi significativamente mais prevalente entre os homens com DE em comparação com os homens que não a apresentam.

Recentemente, Keller; Chung e Lin (2012), em um estudo caso-controle retrospectivo, analisaram os dados de 32.856 pacientes com DE e 162.480 controles para avaliar a associação entre ereção disfuncional e DPC. Eles descobriram que os pacientes com incapacidade de ereção eram 3,35 vezes mais propensos do que os controles de terem sido diagnosticados anteriormente com periodontite.

A pesquisa de Eltas et al. (2013) utilizou para diagnosticar a DE um questionário (*The International Index of Erectile Function Questionnaire*), o qual investiga o comportamento sexual dos indivíduos. Nesse questionário os homens responderam questões referentes a sua função erétil, a satisfação com a relação sexual, a avaliação da função orgástica e do desejo sexual com o objetivo de avaliar o efeito da terapia periodontal sobre a severidade da DE em pacientes com periodontite crônica. No início do estudo o grupo de tratamento continha 32 participantes com ereção disfuncional grave e 28 com moderada; depois de 3

meses, 25, 29 e 6 participantes tinham DE grave, moderada e leve, respectivamente, ou seja, houve uma melhora com o tratamento periodontal.

Assim, todos esses autores relataram que a DPC e a DE foram correlacionadas umas com as outras de forma positiva. No entanto, apesar de todos os dados expostos acima, o real papel da periodontite crônica na fisiopatologia da DE permanece escasso. Isso justifica a realização deste trabalho, visto que é necessária a realização de novos estudos para esclarecer os mecanismos de interação entre tais doenças.

3. REFERÊNCIAS

ALI, J.; PRAMOD, K.; TAHIR, M. A.; ANSARI, S. H. Autoimmune Responses in Periodontal Diseases. **Autoimmun. Rev.**, v. 10, n. 7, p. 426-431, 2011.

ALMEIDA, C. S. L.; DIAS, L. Z. S. The importance of inflammatory cytokines in the causal relationship between periodontal and cardiovascular diseases. **Rev. ABO Nac.**, v. 16, n. 1, p. 5, 2008.

AMAR, S.; GOKCE, N.; MORGAN, S.; LOUKIDELI, M.; VAN DYKE, T. E.; VITA, J. A. Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 7, p. 1245-1249, 2003.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. International Workshop for a classification of periodontal disease and conditions. **Annals Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 7-37, 1999.

ANDERSSON, J.; LIBBY, P.; HANSSON, G. K. Adaptive immunity and atherosclerosis. **Clinical Immunology**, v. 134, n. 1, p. 33-46, 2010.

ANDERSSON, K. E. Pharmacology of penile erection. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, n. 3, p. 417-450, 2001.

ANDERSSON, K. E.; STIEF, C. G. Neurotransmission and the contraction and relaxation of penile erectile tissues. **World J. Urol.**, v. 15, n. 1, p. 14-20, 1997.

ATTSTRON, R. Studies on neutrophil polymorphonuclear leukocytes at the dentogingival junction in gingival health and disease. **J. Periodont. Res.**, v. 8, p. 1-15, 1971.

AVERSA, A.; BRUZZICHES, R.; FRANCOMANO, D.; NATALI, M.; GARERI, P.; SPERA, G. Endothelial dysfunction and erectile dysfunction in the aging man. **Int. J. Urol.**, v. 17, n. 1, p. 38-47, 2010.

AYTA, I. A.; MCKINLAY, J. B.; KRANE, R. J. The likely worldwide increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. **BJU Int.**, v. 84, n. 1, p. 50-56, 1999.

BANKS, E.; JOSHY, G.; ABHAYARATNA, W. P.; KRITHARIDES, L.; MACDONALD, P. S.; KORDA, R. J.; CHALMERS, J. P. Erectile Dysfunction Severity as a Risk Marker for Cardiovascular Disease Hospitalisation and All-Cause Mortality: A Prospective Cohort Study. **PLoS Med.**, v. 10, n. 1, 2013.

BARTRUFF, J. B.; YUKNA, R. A.; LAYMAN, D. L. Outer membrane vesicles from *Porphyromonas gingivalis* affect the growth and function of cultured human gingival fibroblasts and umbilical vein endothelial cells. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 1; p. 972-979, 2005.

BAUMHAKEL, M.; WERNER, N.; BOHM, M.; NICKENIG, G. Circulating endothelial progenitor cells correlate with erectile function in patients with coronary heart disease. **Eur. Heart.**, v. 27, n. 18, p. 2184-2188, 2006.

BECK, J. D.; ELTER, J. R.; HEISS, G.; COUPER, D.; MAURIELLO, S. M.; OFFENBACHER, S. Relationship of periodontal disease to carotid artery intima-media wall thickness. The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, n. 1, p. 1816-1822, 2001.

BERGLUNDH, T.; DONATI, M. Aspects of adaptive host response in periodontitis. Proceedings from the 5th European Workshop on Periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 1, p. 87-107, 2005.

BILLUPS, K.; BANK, A.; PADMA-NATHAN, H.; KATZ, S.; WILLIAMS R. Erectile dysfunction is a marker for cardiovascular disease: results of the Minority Health Institute Expert Advisory Panel. **J. Sex. Med.**, v. 2, n. 1, p. 40-52, 2005.

BIVALACQUA, T. J.; USTA, M. F.; CHAMPION, H. C.; KADOWITZ, P. J.; HELLSTROM, W. J. Endothelial dysfunction in erectile dysfunction: role of the endothelium in erectile physiology and disease. **J. Androl.**, v. 24, n. 1, p. 17-37, 2003.

BLANKENBERG, S.; RUPPRECHT, H. J.; BICKEL, C.; PEETZ, D.; HAFNER, G.; TIRET, L.; MEYER, J. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 104, n. 12, p. 1336-1342, 2001.

BOBETSIS, Y. A.; BARROS, S. P.; OFFENBACHER, S. Exploring the relationship between periodontal disease and pregnancy complications. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 137, n. 3, p. 7-13, 2006.

BRAUNERSREUTHER, V.; MACH, F.; STEFFENS, S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 97, n. 1, p. 714-721, 2007.

BUHLIN, K.; HULTIN, M.; NORDERYD, O.; PERSSON, L.; POCKLEY, A. G.; RABE, P.; KLINGE, B.; GUSTAFSSON, A. Risk factors for atherosclerosis in cases with severe periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 36, n. 1, p. 541-549, 2009.

BURNETT, A. L. Role of nitric oxide in the physiology of erection. **Biol. Reprod.**, v. 52, n. 3, p. 485-489, 1995.

BURNETT, A. L.; NELSON, R. J.; CALVIN, D. C.; LIU, J. X.; DEMAS, G. E.; KLEIN, S. L.; KRIEGSFELD, L. J.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M.; SNYDER, S. H. Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. **Mol. Med.**, v. 2, n. 1, p. 288-296, 1996.

CAMELO-CASTILLO, A. J.; MIRA, A.; PICO, A.; NIBALI, L.; HENDERSON, B.; DONOS, N.; TOMÁS, I. Subgingival microbiota in health compared to periodontitis and the influence of smoking. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 119, 2015.

CERIELLO, A.; TABOGA, C.; TONUTTI, L.; QUAGLIARO, L.; PICONI, L.; BAIS, B.; DA ROS, R.; MOTZ, E. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. **Circulation**, v. 106, n. 1, p. 1211-1218, 2002.

CHANG, S. T.; CHU, C. M.; HSU, J. T.; HSIAO, J. F.; CHUNG, C. M.; HO, C.; PENG, Y. S.; CHEN, P. Y.; SHEE, J. J. Independent determinants of coronary artery disease in erectile dysfunction patients. **J. Sex. Med.**, v. 7, n. 1, p. 1478-1487, 2010.

CHEN, Y. W.; UMEDA, M.; NAGASAWA, T.; TAKEUCHI, Y.; HUANG, Y.; INOUE, Y.; IWAI, T.; IZUMI, Y.; ISHIKAWA, I. Periodontitis may increase the risk of peripheral arterial disease. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, v. 35, n. 2, p. 153-158, 2008.

CHIURLIA, E.; D'AMICO, R.; RRATTI, C.; GRANATA, A. R.; ROMAGNOLI, R.; MODENA, M. G. Subclinical coronary artery atherosclerosis in patients with erectile dysfunction. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 46, n. 8, p. 1503-1506, 2005.

COSTA, C.; VIRAG, R. The endothelial-erectile dysfunction connection: an essential update. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 6, n. 9, p. 2390-2404, 2009.

COTRAN, R. S.; POBER, J. S. Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity, and vascular injury. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 1, n. 3, p. 225-235, 1990.

COTRAN, R. S.; POBER, J. S. Effects of cytokines on vascular endothelium: Their role in vascular and immune injury. **Kidney Int.**, v. 35, n. 4, p. 969-975, 1989.

D'AIUTO, F.; ORLANDI, M.; GUNSOLLEY, J. C. Evidence that periodontal treatment improve biomarkers and CVD outcomes. **J. Clin. Periodontol.**, v. 40, n. 1, p. 85-105, 2013.

DIJHORST-OEI, L. T.; STORES, E. S.; KOOMANS, H. A.; RABELINK, T. J. Acute simultaneous stimulation of nitric oxide and oxygen radicals by angiotensin II in humans in vivo. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 33, n. 3, p. 420-424, 1999.

EATON, C. B.; LIU, Y. L.; MITTLEMAN, M. A.; MINER, M.; GLASSER, D. B.; RIMM, E. B. A retrospective study of the relationship between biomarkers of atherosclerosis and erectile dysfunction in 988 men. **Int. J. Impot. Res.**, v. 19, n. 2, p. 218-225, 2007.

ELESBER, A. A.; SOLOMON, H.; LENNON, R. J.; MATHEW, V.; PRASAD, A.; PUMPER, G.; NELSON, R. E.; MC CONNELL, J. P.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Coronary endothelial dysfunction is associated with erectile dysfunction and elevated asymmetric dimethylarginine in patients with early atherosclerosis. **Eur. Heart. J.**, v. 27, n. 7, p. 824-831, 2006.

ELTAS, A.; OGUZ, F.; USLU, M. O.; AKDEMIR, E. The effect of periodontal treatment in improving erectile dysfunction: a randomized controlled Trial. **J. Clin. Periodontol.**, v. 40, n. 1, p. 148-154, 2013.

ELTER, J. R.; HINDERLITER, A. L.; OFFENBACHER, S.; BECK, J. D.; CAUGHEY, M.; BRODALA, N.; MAD-IANOS, P. N. The effects of periodontal therapy on vascular endothelial function: a pilot trial. **American Heart Journal**, v. 151, n. 1, p. 47, 2006.

FABBRI C. Influência do tratamento da doença periodontal na atividade do lúpus eritematoso sistêmico. Tese. São Paulo – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2007.

FEDELE, S.; SABBAH, W.; DONOS, N.; PORTER, S.; D'AIUTO, F. Common oral mucosal diseases, systemic inflammation, and cardiovascular diseases in a large cross-sectional US survey. **American Heart Journal**, v. 161, n. 2, p. 344-350, 2011.

FEINBLOOM, D.; BAUER, K. A. Assessment of hemostatic risk factors in predicting arterial thrombotic events. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 25, n. 10, p. 2043-2053, 2005.

FORD, P. J.; GAMONAL, J.; SEYMOUR, G. J. Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. **Periodontol**, v. 53, p. 111-123, 2010.

FORNER, L.; LARSEN, T.; KILIAN, M.; HOLMSTRUP, P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. **J. Clin. Periodontol.**, v. 33, n. 6, p. 401-407, 2006.

GARANT, P. R.; MULVIHILL, J. E. The fine structure of gingivitis in the beagle. III. Plasma cell infiltration of the subepithelial connective tissue. **Journal of Periodontal Research**, v. 7, n. 2, p. 161-172, 1972.

GERSH, B. J.; SLIWA, K.; MAYOSI, B. M.; YUSUF, S. Novel therapeutic concepts: the epidemic of cardiovascular disease in the developing world: global implications. **European Heart Journal**, v. 31, n. 6, p. 642-648, 2010.

GIMBRONE, M. A. JR.; CYBULSKY, M. I.; KUME, N.; COLLINS, T.; RESNICK, N. Vascular endothelium. An integrator of pathophysiological stimuli in atherogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 748, n. 1, p. 122-131, 1995.

GLEMBOT, T. M.; BRITT, L. D.; HILL, M. A. Endotoxin interacts with tumor necrosis factor-alpha to induce vasodilation of isolated rat skeletal muscle arterioles. **Shock**, v. 5, n. 4, p. 251-257, 1996.

GULATI, M.; ANAND, V.; JAIN, N.; ANAND, B.; BAHUGUNA, R.; GOVILA, V.; RASTOGI, P. Essentials of Periodontal Medicine in Preventive Medicine. **Int. J. Prev. Med.**, v. 4, n. 9, p. 988-994, 2013.

GUPTA, B. P.; CLIFTON, M. M.; PROKOP, L.; NEHRA, A.; KOPECKY, S. L. The effect of lifestyle modification and cardiovascular risk factor reduction on erectile dysfunction: A systematic review and meta-analysis. **Arch. Intern. Med.**, v. 171, n. 20, p. 1797-1803, 2011.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal disease. **J. Periodontology**, v. 5, n. 1, p. 78-111, 1994.

HANSSON, G. K. Inflammation and immune response in atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 1, n. 2, p. 150-155, 1999.

HARASZTHY, V. I.; HARIHARAN, G.; TINOCO, E. M.; CORTELLI, J. R.; LALLY, E. T.; DAVIS, E.; ZAMBON, J. J. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetem-comitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 6, p. 912-922, 2000a.

HARASZTHY, V. I.; ZAMBON, J. J.; TREVISAN, M.; ZEID, M.; GENCO, R. J. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. **Journal of Periodontal Research**, v. 71, n. 10, p. 1554-1560, 2000b.

HEIDEBAUGH, J. J. Management of erectile dysfunction. **Am Fam Physican**, v. 81, n. 3, p. 305-312, 2010.

HIGASHI, Y.; GOTO, C.; HIDAKA, T.; SOGA, J.; NAKAMURA, S.; FUJII, Y.; HATA, T.; IDEI, N.; FUJIMURA, N.; CHAYAMA, K.; KIHARA, Y.; TAGUCHI, A. Oral infection-inflammatory pathway, periodontitis, is a risk factor for endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 206, n. 2, p. 604-610, 2009.

HIGASHI, Y.; GOTO, C.; JITSUIKI, D.; UMEMURA, T.; NISHIOKA, K.; HIDAKA, T.; TAKEMOTO, H.; NAKAMURA, S.; SOGA, J.; CHAYAMA, K.; YOSHIZUMI, M.; TAGUCHI, A. Periodontal infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients. **Hypertension**, v. 51, n. 1, p. 446-453, 2008.

HIGASHI, Y.; SASAKI, S.; NAKAGAWA, K.; MATSUURA, H.; OSHIMA, T.; CHAYAMA, K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. **N. Engl. J. Med.**, v. 346, n. 25, p. 1954-1962, 2002.

HORTON, J. E.; OPPENHEIN, J. J.; MERGENHAGEM, S. E. A role of cell mediated immunity in the pathogenesis of periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 45, n. 5, p. 351-360, 1974.

IGNARRO, L. J.; BUSH, P. A.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; FUKUTO, J. M.; RAJFER, J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation

cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 170, n. 2, p. 843-850, 1990.

IOAKEIMIDIS, N.; VLACHOPOULOS, C.; ROKKAS, K.; AGGELIS, A.; TEREANTES-PRINTZIOS, D.; SAMENTZAS, A.; ALEXOPOULOS, N.; STEFANADIS, C. Relationship of asymmetric dimethylarginine with penile Doppler ultrasound parameters in men with vasculogenic erectile dysfunction. **European Urology**, v. 59, n. 1, p. 948-955, 2011.

JACKSON, G.; BOON, N.; EARDLEY, I.; KIRBY, M.; DEAN, J.; HACKETT, G.; MONTORSI, P.; MONTORSI, F.; VLACHOPOULOS, C.; KLONER, R.; SHARLIP, I.; MINER, M. Erectile dysfunction and coronary artery disease prediction: evidence-based guidance and consensus. **Int. J. Clin. Pract.**, v. 64, n. 7, p. 848-857, 2010.

JEFFCOAT, M. K.; REDDY, M. S. Progression of probing attachment loss in adult periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 62, n. 3, p. 185-189, 1991.

JOHANNES, C. B.; ARAUJO, A. B.; FELDMAN, H. A.; DERBY, C. A.; KLEINMAN, K. P.; MCKINLAY, J. B. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. **J. Urology**, v. 163, n. 2, p. 460-463, 2000.

KAMINETSKY, J. Epidemiology and pathophysiology of male sexual dysfunction. **Int. J. Impot. Res.**, v. 20, n. 1, p. 3-10, 2008.

KAWANISHI, Y.; LEE, K. S.; KIMURA, K.; KOIZUMI, T.; NAKATSUJI, H.; KOJIMA, K.; YAMAMOTO, A.; NUMATA, A.; SOGOU, T. Screening of ischemic heart disease with cavernous artery blood flow in erectile dysfunctional patients. **Int. J. Impot. Res.**, v. 13, n. 2, p. 100-103, 2001.

KELLER, J. J.; CHUNG, S. D.; LIN, H. C. A nationwide population-based study on the association between chronic periodontitis and erectile dysfunction. **J. Clin. Periodontol.**, v. 39, n. 6, p. 507-512, 2012.

KELSO, A. Cytokines: Principles and prospects. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 76, n. 4, p. 300-317, 1998.

KENDIRCI, M.; NOWFAR, S.; HELLSTROM, W. J. The impact of vascular risk factors on erectile dysfunction. **Drugs Today (Barc)**, v. 41, n. 1, p. 65-74, 2005.

KIRBY, M.; JACKSON, G.; SIMONSEN, U. Endothelial dysfunction links erectile dysfunction to heart disease. **Int. J. Clin. Pract.**, v. 59, n. 2, p. 225-229, 2005.

KLONER, R. A.; MULLIN, S. H.; SHOOK, T.; MATTHEWS, R.; MAYEDA, G.; BURSTEIN, S.; PELED, H.; POLLICK, C.; CHOUDHARY, R.; ROSEN, R.; PADMA-NATHAN, H. Erectile dysfunction in the cardiac patient: How common and should we treat? **J. Urology.**, v. 170, n. 2, p. 46-50, 2003.

KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: Biofilms, interactions, and genetic systems. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 54, n. 1, p. 423-437, 2000.

KRIGER, L. O diferente é formar o generalista. **Rev. de Clin. Pesq. Odontol.**, v. 1, n. 4, p. 7-9, 2005.

LAURENTI, R.; BUCHALLA, C. M.; CARANTIN, C. V. S. Doença isquêmica do coração: internações, tempo de permanência e gastos. Brasil, 1993 a 1997. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 74, n. 6, p. 483-487, 2000.

LEHNER, T.; WILTON, J. M.; CHALLACOMBE, S. J.; IVANYI, L. Sequential cell mediated immune responses in experimental gingivitis in man. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 16, n. 3, p. 481-492, 1974.

LEIVADAROS, E.; VAN DER VELDEN, U.; BIZZARRO, S.; TEN HEGGELER, J. M.; GERDES, V. E.; HOEK, F. J.; NAGY, T. O.; SCHOLMA, J.; BAKKER, S. J.; GANS, R. O.; TEN CATE, H.; LOOS, B. G. A pilot study into measurements of markers of atherosclerosis in periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 1, p. 121-128, 2005.

LERMAN, A.; ZEIHAR, A. Endothelial Function: Cardiac Events. **Circulation**, v. 111, n. 3, p. 363-368, 2005.

LI, X.; KOLLTVEIT, K. M.; TRONSTAD, L.; OLSEN, I. Systemic diseases caused by oral infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 547-558, 2000.

LINDHE, J.; NIKLAUS, L. P.; KARRING, T. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

LYNGDORF, P.; HEMMINGSEN, L. Epidemiology of erectile dysfunction and its risk factors: a practice-based study in Denmark. **Int. J. Impot. Res**, v. 16, n. 2, p. 105-111, 2004.

MATSUMOTO, S.; MATSUDA, M.; TAKEKAWA, M.; OKADA, M.; HASHIZUME, K.; WADA, N.; HORI, J.; TAMAKI, G.; KITA, M.; IWATA, T.; KAKIZAKI, H. Association of ED with chronic periodontal disease. **Int. J. Impot. Res.**, v. 26, n. 1, p. 13-15, 2014.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MONTORSI, P.; MONTORSI, F.; SCHULMAN, C. Is erectile dysfunction the “tip of the iceberg” of a systemic vascular disorder? **Eur. Urol.**, v. 44, n. 3, p. 352-354, 2003.

MONTORSI, P.; RAVAGNANI, P. M.; GALLI, S.; ROTATORI, F.; VEGLIA, F.; BRIGANTI, A.; SALONIA, A.; DEHÒ, F.; RIGATTI, P.; MONTORSI, F.; FIORENTINI, C. Association between erectile dysfunction and coronary artery disease. Role of coronary clinical presentation and extent of coronary vessels involvement: the cobra trial. **Eur. Heart. J.**, v. 27, n. 22, p. 2632-2639, 2006.

MONTORSI, P.; RAVAGNANI, P. M.; GALLI, S.; ROTATORI, F.; BRIGANTI, A.; SALONIA, A.; RIGATTI, P.; MONTORSI, F. The artery size hypothesis: a macrovascular link between erectile dysfunction and coronary artery disease. **Am. J. Cardiol.**, v. 96, n. 12, p. 19-23, 2005.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v. 349, p. 1436-1442, 1997.

O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 477-487, 2008.

OGUZ, F.; ELTAS, A.; BEYTUR, A.; AKDEMIR, E.; ÖZAY, M.; GÜNES, A. Is There a Relationship Between Chronic Periodontitis and Erectile Dysfunction? **The journal of sexual medicine**, v. 10, n. 3, p. 838-843, 2013.

OSCARSSON, J.; KARCHED, M.; THAY, B.; CHEN, C.; ASIKAINEN, S. Proinflammatory effect in whole blood by free soluble bacterial components released from planktonic and biofilm cells. **BMC. Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 206, 2008.

PAGE, R. C.; SCHROEDER, H. E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. **Lab. Invest.**, v. 34, n. 3, p. 235-249, 1976.

PENG, S.; ZHNG, D. X. Chronic periodontal disease may be a sign for erectile dysfunction in men. **Med. Hypotheses.**, v. 73, n. 5, p. 859-860, 2009.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal disease. **Lancet**, v. 366, n. 1, p. 1809-1820, 2005.

POPOVIC, M.; SMILJANIC, K.; DOBUTOVIC, B.; SYROVETS, T.; SIMMET, T.; ISENOVIC, E. R. Human cytomegalovirus infection and atherothrombosis. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 33, n. 2, p. 160-172, 2012.

RAJFER, J.; ARONSON, W. J.; BUSH, P. A.; DOREY, F. J.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. **N. Engl. J. Med.**, v. 326, n. 2, p. 90-94, 1992.

ROSS, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**, v. 362, n. 6423, p. 801-809, 1993.

SABA-CHUJFI, E.; PEREIRA, S. A. D. S.; DIAS, L. Z. S. Inter-relação das doenças periodontais com as doenças cardiovasculares e cerebrovasculares isquêmicas. **R. Periodontia**, v. 17, n. 2, p. 21-31, 2007.

SCHENKEIN, H. A.; LOOS, B. G. Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. **J. Clin. Periodontol.**, v. 40, n. 1, p. 51-69, 2013.

SHARMA, A.; PRADEEP, A. R.; RAJU, P. A. Association between chronic periodontitis and vasculogenic erectile dysfunction. **J. Periodontol.**, v. 82, n. 12, p. 1665-1669, 2011.

SIROKY, M. B.; AZADZOI, K. M. Vasculogenic erectile dysfunction: newer therapeutic strategies. **J. Urology.**, v. 170, n. 1, p. 24-29, 2003.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; GOODSON, J. M.; LINDHE, J. New concepts of destructive periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 11, n. 1, p. 21-32, 1984.

SOLOMON, H.; MAN, J.; JACKSON, G. Erectile dysfunction and the cardiovascular patient: endothelial dysfunction is the common denominator. **Heart**, v. 89, n. 3, p. 251-253, 2003.

SOUZA, E. C. F.; OLIVEIRA, A. G. R. C. **O processo saúde-doença: do xamã ao cosmos.** In: Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Departamento de Odontologia. Odontologia social: textos selecionados. Natal: Editora da UFRN, p. 87-92, 1998.

SPOSITO, A. C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F. A. H.; BERTOLAMI, M. C. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 88, n. 1, p. 2-19, 2007.

STEPHANIE, M.; MELLER, S. M.; STILP, E.; WALKER, C. N.; MENA-HURTADO, C. The Link Between Vasculogenic Erectile Dysfunction, Coronary Artery Disease, and Peripheral Artery Disease: Role of Metabolic Factors and Endovascular Therapy. **J. Invasive Cardiol.**, v. 25, n. 6, p. 313-319, 2013.

TAYAL, V.; KALRA, B. S. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics-An update. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 579, n. 1, p. 1-12, 2008.

THODEN VAN VELZEN, S. K.; ABRAHAM-INPIJN, L.; MOORER, W. R. Plaque and systemic disease: a reappraisal of the focal infection concept. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 11, n. 4, p. 209-220, 1984.

TODA, N.; AYAJIKI, K.; OKAMURA, T. Nitric oxide and penile erectile function. **Pharmacol. Ther.**, v. 106, n. 2, p. 233-266, 2005.

TRAISH, A. M.; ABU-ZAHRA, H.; GUAY, A. T. The brain, the penis and steroid hormones: clinical correlates with endothelial dysfunction. **Curr. Pharm. Des.**, v. 14, n. 35, p. 3723-3736, 2008.

TREPELS, T.; ZEIHNER, A. M.; FICHTLSCHERER, S. The endothelium and inflammation. **Endothelium**, v. 13, n. 6, p. 423-429, 2006.

VILA, E.; SALAICES, M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 288, n. 3, p. 1016-1021, 2005.

VIRAG, R.; BOUILLY, P.; FRYDMAN, D. Is impotence an arterial disorder? A study of arterial risk factors in 440 impotent men. **Lancet**, v. 1, n. 8422, p. 181-184, 1985.

VLACHOPOULOS, C.; ROKKAS, K.; IOAKEIMIDIS, N.; STEFANADIS, C. Inflammation, metabolic syndrome, erectile dysfunction, and coronary artery disease: common links. **Eur. Urol.**, v. 52, n. 1, p. 1590-600, 2007.

VLACHOPOULOS, C.; AZNAOURIDIS, K.; IOAKEIMIDIS, N.; ROKKAS, K.; VASILIADOU, C.; ALEXOPOULOS, N.; STEFANADI, E.; ASKITIS, A.; STEFANADIS, C. Unfavourable endothelial and inflammatory state in erectile dysfunction patients with or without coronary artery disease. **Eur. Heart J.**, v. 27, n. 22, p. 2640-2648, 2006.

WITTE, D. R.; BROEKMANS, W. M.; KARDINAAL, A. F.; KLOPPING-KETELAARS, I. A.; VAN POPPEL, G.; BOTS, M. L. Soluble intercellular adhesion molecule 1 and flow-mediated dilatation are related to the estimated risk of coronary heart disease independently from each other. **Atherosclerosis**, v. 170, n. 1, p. 147-153, 2003.

WOOLLARD, K. J.; GEISSMANN, F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. **Nature Cardiology in Review**, v. 7, n. 2, p. 77-86, 2010.

ZADIK, Y.; BECHOR, R.; GALOR, S.; JUSTO, D.; HERUTI, R. J. Erectile dysfunction might be associated with chronic periodontal disease: Two ends of the cardiovascular spectrum. **J. Sex. Med.**, v. 6, n. 1, p. 1111-1116, 2009.

ZHANG, C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. **Basic. Res. Cardiol.**, v. 103, n. 5, p. 398-406, 2008.

ZHANG, L.; PEPPEL, K.; SIVASHANMUGAM, P.; ORMAN, E. S.; BRIAN, L.; EXUM, S. T.; FREEDMAN, N. J. Expression of tumor necrosis factor receptor-1 in arterial wall cells promotes atherosclerosis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 27, n. 1, p. 1087-1094, 2007.

ZUO, Z.; JIANG, J.; JIANG, R.; CHEN, F.; LIU, J.; YANG, H.; CHENG, Y. Effect of Periodontitis on Erectile Function and Its Possible Mechanism. **J. Sex. Med.**, v. 8, n. 9, p. 2598-2605, 2011.

4. ARTIGO CIENTÍFICO 1

**INFLUENCE OF EXPERIMENTAL PERIODONTITIS ON THE SEXUAL BEHAVIOR
OF MALE WISTAR RATS**

Artigo submetido à revista Archives of Oral Biology
<http://www.journals.elsevier.com/archives-of-oral-biology/>

Carta de Submissão: Archives of Oral Biology

Archives of Oral Biology
Ref: AOB-D-15-00021

Title: Influence of Experimental Periodontitis on the Sexual Behavior of Male Wistar Rats

Authors: Stefany Pedrotti, Patricia Oehlmeyer Nassar, Sara C Sagae, Karine Figueredo da Costa, Celia Cristina Leme Beu, Carlos Nassar

Article Type: Original Paper

Dear canassar,

Your submission entitled "Evaluation of the Influence of Experimental Periodontitis on the Sexual Behavior of Male Wistar Rats" has been assigned the following manuscript number: AOB-D-15-00021.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/aob/>.

Thank you for submitting your work to this journal. Please do not hesitate to contact me if you have any queries.

Kind regards,

Administrative Support Agent [30-Mar-11]
Archives of Oral Biology

For any technical queries about using EES, please contact Elsevier Author Support at authorsupport@elsevier.com

Influence of Experimental Periodontitis on the Sexual Behavior of Male Wistar Rats

Stefany Pedrotti^{a,1}, Patricia Oehlmeyer Nassar^{b,2}, Sara C Sagae^{c,3}, Karine Figueredo da Costa^{d,4}, Célia Cristina Leme Beu CCL^{e,5}, Carlos Augusto Nassar^{f,6,*}

^aMA program in Biosciences and Health, State University of West Paraná (UNIOESTE), Cascavel, Paraná, Brazil.

^bDentistry Course, UNIOESTE and MA program in Biosciences and Health, UNIOESTE, Cascavel, Paraná, Brazil;

^cCenter of Biological Sciences and of Health, UNIOESTE, Cascavel, Paraná, Brazil

^dMA program in Dentistry, UNIOESTE, Cascavel, Paraná, Brazil.

^eCenter of Medical and Pharmaceutical Sciences and MA program in Biosciences and Health, UNIOESTE, Cascavel, Paraná, Brazil.

^fDentistry Course, UNIOESTE and MA program in Biosciences and Health, UNIOESTE, Cascavel, Paraná, Brazil;

ABSTRACT

Introduction. Many studies have reported a correlation between periodontal disease and erectile dysfunction in men. This effect may be due to endothelial dysfunction induced by periodontal infection. *Aim.* To evaluate the sexual behavior of adult male rats with experimental periodontitis. *Methods.* Fourteen male rats were divided into the following two groups: non-ligature, control (control; n = 7) and experimental with ligature (ligature, n = 7). The latter group had a ligature around each lower first molar for the development of experimental periodontitis. After 30 days of induction of periodontitis, the sexual behavior of the male rats was recorded between 20:00-21:00, with lighting provided by a dim light. Initially, the males were placed in an observation cage for an adaption period of 15 min. After this time, a sexually receptive female was introduced into the cage with the male. The interference frequency parameters (the number of times the male performed penile intrusion) and the ejaculation latency (the time it took for male ejaculation) were recorded. *Results.* The rats in the ligature group showed a decrease (P <0.05) in the intrusion frequency (1.1 ± 0.8) compared with the control group (12.3 ± 1.9) and ejaculation was not observed in the ligature group during the maximum recording time (1800s). *Conclusion.* Experimental periodontitis contributed to a reduction in the sexual behavior of male rats.

KEYWORDS: periodontitis, dysfunction erectile, sexual behavior.

¹Address: Rua Estilac Leal, 21, São Cristovão, Cascavel, Paraná, Brasil – CEP 85816-240

²Address: Rua Pernambuco, 593, apto 504, Centro, Cascavel, Paraná, Brasil – CEP 85810-020.

³Address: Rua Elias Maximiliano, 216, Nova Cidade, Cascavel, Paraná, Brasil - CEP 85803-175

⁴Address: Rua José Sampaio Xavier, 768, Santa Felicidade, Cascavel, Paraná, Brasil – CEP 85803-300

⁵Address: Rua São Paulo, 1411, apto 32, Centro, Cascavel, CEP 85801020.

^{6,*}Address: *Corresponding author. Address: Rua Pernambuco, 593, apto 504, Centro, Cascavel, Paraná, Brasil –CEP 85810-020. Fax: +55 45 32203169, e-mail address: canassar@yahoo.com.

INTRODUCTION

Periodontal disease is characterized by an inflammatory response in periodontal tissues. It is often asymptomatic and is caused by microorganisms that are present in bacterial plaque. The clinical manifestation of the disease depends on the nature of this response¹. Gingivitis is the mildest form of periodontal disease; it does not affect the underlying support structures of the teeth and is reversible. Periodontitis results in the loss of connective tissue and bone support through the action of toxic products that are released in the subgingival area for specific periodontal pathogens, as well as an inflammatory response that is triggered by the presence of these microorganisms².

Many studies have reported that chronic periodontitis may trigger systemic vascular diseases of the coronary, cerebrovascular and chronic obstructive pulmonary type through the induction of endothelial dysfunction^{3,4}. Periodontal infection may indirectly induce endothelial dysfunction via a state of systemic inflammation, as evidenced by a high concentration of pro-inflammatory cytokines in the plasma⁵⁻⁸.

Thus, it is reasonable to believe that systemic inflammation induced by periodontal pathogens may be associated with endothelial dysfunction and atherosclerosis, firstly in small vessels, such as vascular in the penis, and later in larger arteries such as the coronaries⁹.

Therefore, we suggest that there is a correlation between periodontal disease and erectile dysfunction, which has been supported by Peng and Zhng¹⁰, who have suggested that periodontal disease may induce erectile dysfunction because it contributes to endothelial dysfunction.

The objective of this study was to evaluate the sexual behavior of adult Wistar rats with experimental periodontitis induced by ligature.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Pregnant rats were obtained from the Central Animal Facility of the State University of West Paraná (UNIOESTE), Cascavel campus, and kept in the vivarium of the Laboratory of Endocrine Physiology and Metabolism under controlled

conditions of temperature (23 ± 2 °C) and light (12-hour cycle of light and 12 hours of darkness - 07:00 to 19:00). At birth, the pups were separated by sex, with only 7 males for each litter, making a total of 14 animals, which were divided into 2 groups and all the animals received standard diet and water at will throughout the experimental period. All the experimental protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Experiments and Practical Classes (CEEAAP) of UNIOESTE.

Induction of Periodontal Disease

At 70 days of age, the animals were anesthetized (xylazine 0.04 mL/100 g and ketamine 0.08 mL/100 g), and placed on an appropriate operating table, which permitted the opening of the mouths of the rats, facilitating access to the posterior mandible teeth. With the aid of modified forceps and an exploratory probe, a number 40 cotton thread was tied around the first right and left lower molars. Two groups were then designated: the first being control without ligature (CON) and the second being experimental with ligature (LIG). This ligature acted as a gingival irritant for 30 days, which favored the accumulation of bacterial plaque and the subsequent development of periodontal disease¹¹.

Analysis of sexual behavior

Thirty days after the induction of periodontal disease, the sexual behavior of the rats in both the control and the experimental groups was recorded (Samsung Camera ST2014F) between 20:00 and 21:00. The observations were performed during the period of darkness with illumination provided by a weak light because sexual behavior is slightly more intense during the phase of darkness. Initially, the male rat was placed in the observation cage (70 x70 x35 cm) for an adjustment period of 15 min. After this period a sexually receptive female was introduced into the cage with the male and the following parameters of the behavior of the male rat were recorded:

- a) frequency of smelling the anogenital region;
- b) frequency of mounts with pelvic movements. According to Agmo¹², the male normally mounts from behind, putting its front paws on the back of the female and making rapid anteroposterior pelvic thrusts (17-22 Hz) for about 300 ms. During

mounting, the female assumes a lordosis posture. The male then dismounts very slowly;

c) latency (seconds) of intrusion behavior. The time from the introduction of the female into the observation cage until the first intrusion by the male (deep forward momentum, featuring vaginal penetration). If the rat did not intrude into the female within 10 minutes it was considered to be sexually inactive;

d) latency (seconds) of ejaculation. The time from the first intromission to ejaculation. Ejaculation was evidenced by penetration with deep pelvic movements and then lying slowly to the side, followed by a refractory period¹². If a rat intruded, but did not ejaculate soon afterwards, then the recording was continued for up to 30 minutes, otherwise the rat was considered to be sexually inactive;

e) duration (seconds) of general movement. The total duration of movement during the recording session was recorded in order to evaluate possible motor abnormalities caused by the protocol of the induction of periodontal disease.

The animals were filmed until the moment of ejaculation. The latency of intrusion and the frequency of intrusion were analyzed within the first 10 minutes of the 30 minutes recorded period because, in the majority of the control rats, the recording session corresponded to 10 minutes. When the frequency of intrusion was zero, the latency of intrusion was considered to be 600 seconds. In rats that did not exhibit intrusion, the ejaculation latency was considered to be 1800 seconds.

RESULTS

The frequency of sniffing the anogenital region averaged 8.2 ± 1.0 for the control group and 12.7 ± 1.2 for the experimental group. In the control group, it was observed that when the rats were introduced into the observation cage they smelled the female to recognize her before starting intercourse for a shorter time than the rats in the ligature group (Table 1).

Considering that the introduction of the penis was not directly visible, we recorded the behavior leading up to penetration, which was characterized by the male rat placing its forepaws on the back of the female with associated pelvic rhythmic movements¹³. The rats in the ligature group showed a decrease ($P < 0.05$) in the frequency of intrusion (1.1 ± 0.8) compared with the control group (12.3 ± 1.9).

The increase in erectile function was implicated in an increase in intrusion. Consequently, the latency of introduction behavior was 600 seconds for the ligature group, i.e. in this group penile intrusion was not observed, which reflected a decrease in sexual desire, as in the control group the latency of intrusion was 19 seconds (Table 1).

The latency of ejaculation was 980 seconds for the control group and 1800 seconds for the ligature group. Because the experimental group did not provide evidence of intrusion there was no ejaculation in the ligature group during the maximum recording time (1800s) (Table 1).

The duration of the general movement averaged 74.8 ± 8.4 for the control group and 112.0 ± 7.1 for the ligature group. Thus, it is apparent that the animals in the ligature group moved more in their cage without performing the sexual act, which suggests reduced sexual behavior or libido in the experimental group, considering that the male rats were in the presence of sexually receptive females and did not mount them. The fact that some rats moved more is because they were getting to know the environment by smelling, like any other rat, however, because they had no interest in the female rats they spent that time recognizing the environment (Table 1).

For the statistical analysis, all the numerical values were expressed as mean \pm standard error of the mean, except for the latency data (ejaculation and introduction behavior), where the median (interquartile range) was used. Student's t-test was performed, followed by the Newman-Keuls test or the Mann-Whitney test (latency).

DISCUSSION

This study investigated the effect of periodontal disease on the sexual behavior of adult male Wistar rats. It was found that this disease worsened the sexual arousal of the rats, as indicated by an increase in the latency of intrusion. In addition, the intrusion frequency (erectile component) was decreased in the control group. Thus, bearing in mind that this study demonstrated that the experimental group had changes in various parameters of sexual behavior, this indicates a possible erectile dysfunction associated with periodontitis.

Although several vasodilators have been implicated in affecting erectile response, nitric oxide appears to be the major stimulator of cavernosal vasodilation

and penile erection¹⁴⁻¹⁶. An intact endothelium usually releases this potent vasodilator, which maintains vascular reactivity. However, levels of nitric oxide decrease when there are endothelial lesions, and the vasculature is therefore less reactive. Consequently, it is reasonable to postulate that any substance that reduces relaxation mechanisms or increases the contractile mechanisms of the cells of the smooth cavernous muscle may be a causative agent of erectile dysfunction. In this regard, various cytokines, particularly tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), appear as the most important candidate in the pathophysiology of erectile dysfunction, due to its known effects on the vasculature. Studies have shown that there is a common pathogenesis for both erectile dysfunction and for endothelial dysfunction, and when the latter is present in the penis it strongly contributes to erectile dysfunction¹⁷⁻²⁰. Likewise, Montorsi, Montorsi and Schulman²¹ and Kirby, Jackson and Simonsen²² have shown that erectile dysfunction can be the result of impaired endothelial function, as well as occlusion of the cavernous arteries by atherosclerosis.

Chronic periodontitis may contribute to the development of endothelial dysfunction, and there are three possible mechanisms to explain how this occurs. Firstly, because chronic inflammation is associated with an increase in reactive oxygen species^{23,24}. The excess production of reactive oxygen species leads to an increase in the inactivation of nitric oxide (NO) and damage to the antioxidant system may contribute to endothelial dysfunction in patients with periodontitis²⁵. Secondly, high concentrations of inflammatory mediators such as TNF- α , interleukin-6 (IL-6), IL-8 and IL-18 may be associated with an increased risk of endothelial dysfunction^{26,27} because the concentrations of these inflammatory markers are also increased in patients with chronic periodontitis²⁸. Thirdly, periodontal pathogens, or their products, may directly affect endothelial function²⁹. Therefore, periodontal disease can be considered a risk factor in relation to erectile dysfunction because endothelial dysfunction is a key event in the pathophysiology of erectile dysfunction, corroborating the results presented in this study (Table 1).

Although there are no other studies in the literature that examine the sexual behavior of rats with periodontal disease, research such as that conducted by Eltas et al.³⁰ used a questionnaire to diagnose erectile dysfunction (The International Index of Erectile Function Questionnaire), and also investigated the sexual behavior of

individuals. In this questionnaire, men answered questions regarding their erectile function, satisfaction with sexual intercourse, evaluation of orgasmic function and sexual desire in order to evaluate the effect of periodontal therapy on the severity of erectile dysfunction in patients with chronic periodontitis. It was revealed that the severity of erectile dysfunction improved with periodontal treatment. At the beginning of the study the treatment group consisted of 32 individuals with severe erectile dysfunction and 28 with moderate erectile dysfunction; after 3 months, 25, 29 and 6 individuals had severe, mild and moderate erectile dysfunction, respectively.

Several other studies in the literature demonstrate the relationship between periodontal disease and erectile dysfunction^{31-33,9,34}. Among them, is a study of rats by Zuo et al.³⁴, which reported that a decrease in the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and the activity of the enzyme nitric oxide synthase (NOS) in the cavernous tissue of the penis caused by the systemic inflammatory state in periodontitis may be one of the important risk factors for erectile dysfunction. The results of this particular study also showed that TNF- α concentrations in rats with periodontitis were significantly higher than in the control group. One of the roles of TNF- α is the inhibition of expression of eNOS in endothelial cells.

Although the penile vascular layers, which are responsible for erection of the penis, are far from the source of inflammation in individuals suffering from periodontitis, the endothelium is in direct contact with circulating blood and can still suffer from systemic oxidative stress. Furthermore, even if only low concentrations of inflammatory cytokines induced by oxidative stress and periodontitis can reach the penile endothelium, the prognosis of endothelial dysfunction is cumulative³⁵ as the chronic nature of periodontitis. Therefore, the loss of the functional integrity of the endothelium and subsequent endothelial dysfunction plays a key role in the occurrence of erectile dysfunction³⁶.

The results of a study by Oguz et al.³² reinforce the idea that chronic periodontitis is more often present in patients with erectile dysfunction than in those without it. In addition, the higher level of bleeding on probing seen in the group with erectile dysfunction compared with the control group, and the correlation between bleeding on probing and erectile dysfunction, supports earlier reports that a high level of infection results in erectile dysfunction due to endothelial dysfunction.

Coincidentally, Zadik et al.⁹ reported that chronic periodontitis was significantly more prevalent among men with erectile dysfunction compared to men without erectile dysfunction, and they suggested that this may be associated with periodontitis.

A recent retrospective case-control study by Keller, Chung and Lin³¹ analyzed data from 32,856 patients with erectile dysfunction and 162,480 control patients in order to evaluate the association between erectile dysfunction and chronic periodontitis. They found that the patients with erectile dysfunction were 3.35 times more likely than the controls to have been previously diagnosed with periodontitis. Another study by Sharma, Pradeep and Raju³³ concluded that the prevalence of chronic periodontitis in patients with erectile dysfunction was higher for men who had severe erectile dysfunction (81.8%).

CONCLUSIONS

Thus, within the limits of our experimental study, it can be concluded that experimental periodontitis contributed to a reduction in the sexual behavior of male rats. This suggests an erectile dysfunction in the group with induced periodontitis because erectile function is, in most cases, directly related to improved sexual performance³⁷.

Acknowledgments

This study was supported by CAPES and Araucária Foundation. The authors report no conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

1. Ford PJ, Gamonal J, Seymour GJ. Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2010; 53: 111-123.
2. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal disease. *Lancet* 2005; 366: 1809-1820.
3. Bobetsis YA, Barros SP, Offenbacher S. Exploring the relationship between periodontal disease and pregnancy complications. *J. Am. Dent. Assoc.* 2006; 137: 7-13.
4. Chang ST, Chu CM, Hsu JT, Hsiao JF, Chung CM, Ho C, Peng YS, Chen PY, Shee JJ. Independent determinants of coronary artery disease in erectile dysfunction patients. *J. Sex. Med.* 2010; 7:1478-1487.
5. Leivadaros E, Van Der Velden U, Bizzarro S, Ten Heggeler JM, Gerdes VE, Hoek FJ, Nagy TO, Scholma J, Bakker SJ, Gans RO, Ten Cate H, Loos BG. A pilot study into measurements of markers of atherosclerosis in periodontitis. *Journal of*

Periodontology 2005; 76: 121-128.

6. Buhlin K, Hultin M, Norderyd O, Persson L, Pockley AG, Rabe P, Klinge B, Gustafsson A. Risk factors for atherosclerosis in cases with severe periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 2009; 36: 541-549.
7. Higashi Y, Goto C, Hidaka T, Soga J, Nakamura S, Fujii Y, Hata T, Idei N, Fujimura N, Chayama K, Kihara Y, Taguchi A. Oral infection-inflammatory pathway, periodontitis, is a risk factor for endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2009; 206: 604-610.
8. Fedele S, Sabbah W, Donos N, Porter S, D'aiuto F. Common oral mucosal diseases, systemic inflammation, and cardiovascular diseases in a large cross-sectional U.S. survey. *American Heart Journal* 2011; 161: 344-350.
9. Zadik Y, Bechor R, Galor S, Justo D, Heruti RJ. Erectile dysfunction might be associated with chronic periodontal disease: two ends of the cardiovascular spectrum. *J. Sex. Med.* 2009; 6: 1111-1116.
10. Peng S, Zhng DX. Chronic periodontal disease may be a sign for erectile dysfunction in men. *Med. Hypotheses.* 2009; 73: 859-860.
11. Nassar PO, Nassar CA, Guimarães MR, Aquino SG, Andia DC, Muscara MN, Spolidorio DM, Rossa CJr, Spolidorio LC. Simvastatin therapy in cyclosporine a-induced alveolar bone loss in rats. *J. Periodontal. Res.* 2009; 44: 479-488.
12. Agmo A. Male rat sexual behavior. *Brain Research Protocols* 1997; 1: 203-209.
13. Paidon MJ, Lucion AB. The effect of testosterone and doi (1-(2,5 dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane) on male sexual behavior of rats. *Eur. J. Pharmacol* 1995; 277: 1-6.
14. Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J. Nitric oxide and cyclic gmp formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 170: 843-850.
15. Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, Ignarro LJ. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N. Engl. J. Med.* 1992; 326: 90-94.
16. Burnett AL, Nelson RJ, Calvin DC, Liu JX, Demas GE, Klein SL, Kriegsfeld LJ, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide-dependent penile erection in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Mol. Med.* 1996; 2: 288-296.
17. Elesber aa, olomon h, lennon rj, mathew v, prasad a, pumper g, nelson re, mc connell jp, lerman lo, lerman a. Coronary endothelial dysfunction is associated with erectile dysfunction and elevated asymmetric dimethylarginine in patients with early atherosclerosis. *Eur. Heart. J.* 2006; 27: 824-831.
18. Baumhakel M, Werner N, Bohm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells correlate with erectile function in patients with coronary heart disease. *Eur. Heart.* 2006; 27: 2184-2188.
19. Costa C, Virag R. The endothelial-erectile dysfunction connection: an essential update. *The Journal of Sexual Medicine* 2009; 6: 2390-2404.
20. Ioakeimidis N, Vlachopoulos C, Rokkas K, Aggelis A, Terentes-printzios D, Samentzas A, Alexopoulos N, Stefanadis C. Relationship of asymmetric dimethylarginine with penile doppler ultrasound parameters in men with vasculogenic erectile dysfunction. *European Urology* 2011; 59: 948-955.
21. Montorsi P, Montorsi F, Schulman C. Is erectile dysfunction the "tip of the iceberg" of a systemic vascular disorder? *Eur. Urol.* 2003; 44: 352-354.

22. Kirby M, Jackson G, Simonsen U. Endothelial dysfunction links erectile dysfunction to heart disease. *Int. J. Clin. Pract.* 2005; 59: 225-229.
23. Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346: 1954-1962.
24. Dijkhorst-oei LT, Stores ES, Koomans HA, Rabelink TJ. Acute simultaneous stimulation of nitric oxide and oxygen radicals by angiotensin ii in humans in vivo. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999; 33: 420-424.
25. Higashi Y, Goto C, Jitsuiki D, Umemura T, Nishioka K, Hidaka T, Takemoto H, Nakamura S, Soga J, Chayama K, Yoshizumi M, Taguchi A. Periodontal infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients. *Hypertension* 2008; 51: 446-453.
26. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Ioakeimidis N, Rokkas K, Vasiliadou C, Alexopoulos N, Stefanadi E, Askitis A, Stefanadis C. Unfavourable endothelial and inflammatory state in erectile dysfunction patients with or without coronary artery disease. *Eur. Heart J.* 2006; 27: 2640-2648.
27. Eaton CB, Liu YL, Mittleman MA, Miner M, Glasser DB, Rimm EB. A retrospective study of the relationship between biomarkers of atherosclerosis and erectile dysfunction in 988 men. *Int. J. Impot. Res.* 2007; 19: 218-225.
28. Ali J, Pramod K, Tahir MA, Ansari SH. Autoimmune responses in periodontal diseases. *Autoimmun. Rev.* 2011; 10: 426-431.
29. Forner L, Larsen T, Kilian M, Holmstrup P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J. Clin. Periodontol.* 2006; 33: 401-407.
30. Eltas A, Oguz F, Uslu MO, Akdemir E. The effect of periodontal treatment in improving erectile dysfunction: a randomized controlled trial. *J. Clin. Periodontol.* 2013; 40: 148-154.
31. Keller JJ, Chung SD, Lin HC. A nationwide population-based study on the association between chronic periodontitis and erectile dysfunction. *J. Clin. Periodontol.* 2012; 39: 507-512.
32. Oguz F, Eltas A, Beytur A, Akdemir E, Ozay M, Günes A. Is there a relationship between chronic periodontitis and erectile dysfunction? *The Journal of Sexual Medicine* 2013; 10: 838-843.
33. Sharma A, Pradeep AR, Raju PA. Association between chronic periodontitis and vasculogenic erectile dysfunction. *J. Periodontol.* 2011, 82: 1665-1669.
34. Zuo Z, Jiang J, Jiang R, Chen F, Liu J, Yang H, Cheng Y. Effect of periodontitis on erectile function and its possible mechanism. *J. Sex. Med.* 2011; 8: 2598-2605.
35. Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Quagliari L, Piconi L, Bais B, Da Ros R, Motz E. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation* 2002, 106: 1211-1218.
36. Aversa A, Bruzziches R, Francomano D, Natali M, Gareri P, Spera G. Endothelial dysfunction and erectile dysfunction in the aging man. *Int. J. Urol.* 2010; 17: 38-47.
37. Fink KS, Carson CC, Devellis RF. Adult circumcision outcomes study: effect on erectile function, penile sensitivity, sexual activity and satisfaction. *J. Urol.* 2002; 167: 2113-2116.

TABLE

Table 1. Effect of the induction of periodontal disease in the frequency of the behaviours of sniffing the anogenital region; mounting movements; the latencies (s) of penile insertion in the presence of a sexually receptive female (R); ejaculation and the overall duration of general movement.

BEHAVIOR	CONTROL	EXPERIMENTAL
Frequency of smelling the anogenital region ^{d, f}	8.2 ± 1.0	12.7 ± 1.2 ^a
Frequency of mountings with pelvic movements ^{d, f}	12.3 ± 1.9	1.1 ± 0.8 ^a
Latency of introduction behavior ^{d, e}	19 (16/32)	600 (600/600) ^b
Latency of ejaculation ^{c, e}	980(825/1080)	1800 (1800/1800) ^b
Duration of general movement ^{d, f}	74.8 ± 8.4	112.0 ± 7.1 ^a

a $P < 0.05$ vs control (Student–Newman–Keuls test).

b $P < 0.05$ vs control (Mann-Whitney test).

c Corresponds to 30 minutes recording; Control $n=07$; Ligature $n=07$.

d Corresponds to 10 minutes recording; Control $n=07$; Ligature $n=07$.

e Results expressed as medians (interquartile range).

f Results expressed as mean ± standard error of the mean.

4.1 ANEXO A: Normas da Revista Científica

Archives of Oral Biology

Guide for Authors

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology
- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology
- pathogenesis
- microbiology
- biology of dental caries and periodontal disease
- forensic dentistry
- neuroscience
- comparative anatomy
- paeleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

These guidelines generally follow the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscript Structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Conclusions The main conclusions of the study may be presented in a short

Conclusions

section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- *Title*. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- *Author names and affiliations*. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- *Corresponding author*. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

- *Present/permanent address*. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes. As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible.

Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition: ADP, AMP, ATP, DEAEcellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris. Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the Int J Syst Bacteriol since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see Int J Syst

Bacteriol 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case Roman e.g. 'meningococcus'

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

All manuscripts should use the 'Vancouver' style for references, which should be numbered consecutively in the order in which they are first cited in the text and listed at the end of the paper.

For journal references, all authors should be included when there are six or fewer (first six followed by 'et al.' when seven or more), followed by the title of article, name of journal abbreviated according to Index Medicus, or left in full, year, volume with part number in brackets, and first and last pages. For example:

1. Walsh NP, Montague JC, Callow N and Rowlands AV. Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. *Arch Oral Biol* 2004;49(2):149-154.

For book references, the author(s) should be followed by the chapter title (if appropriate), editor(s) (if applicable), book title, place of publication, publisher, year and page numbers. For example:

Nanci A. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function. 6th ed. St. Louis: Mosby; 2003.

Papers in the course of publication should only be entered in the references if the paper has been accepted by a journal, and then given in the standard manner in the text and list of references but with the words "In press" following the name of the journal.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers
- All necessary files have been uploaded, and contain:
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)
- Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

5. ARTIGO CIENTÍFICO 2

**INFLUÊNCIA DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL SOBRE OS TECIDOS
PERIODONTAIS E PÊNIS DE RATOS**

Artigo submetido à revista Journal of Periodontology
<http://www.perio.org/journal/journal.html>

Influência da Periodontite Experimental sobre os Tecidos Periodontais e Pênis de Ratos

Stefany Pedrotti^{*}, Viviane Pontillo^o, Patrícia Oehlmeyer Nassar⁺, Karine Figueredo da Costa^o, Célia Cristina Leme Beu^{*}, Carlos Augusto Nassar⁺

^{*}Curso de Pós-Graduação Nível Mestrado em Biociências e Saúde – UNIOESTE, Cascavel, Paraná.

^oCurso de Graduação em Odontologia – UNIOESTE, Cascavel, Paraná.

⁺Curso de Odontologia da UNIOESTE e do Curso de Pós-Graduação Nível Mestrado em Biociências e Saúde – UNIOESTE, Cascavel, Paraná.

^o Curso de Pós-Graduação Nível Mestrado em Odontologia – UNIOESTE, Cascavel, Paraná.

Correspondência: Dr. Carlos Augusto Nassar, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária, 2069, Jardim Universitário, Cascavel, Paraná, Brasil Fax:(0xx5545) 32203000; e-mail: canassar@yahoo.com

RESUMO

Objetivo: Estudos sugerem que a periodontite pode estar relacionada com a disfunção erétil, no entanto pouco se conhece sobre o efeito desta doença na estrutura do pênis. Este estudo objetivou investigar o efeito da periodontite experimental sobre o pênis de ratos.

Metodologia: Dezoito ratos *Wistar* foram submetidos à colocação de uma ligadura de algodão em torno dos primeiros molares inferiores para induzir a periodontite. Aos trinta dias de indução da doença periodontal, os ratos foram sacrificados e coletadas as amostras de hemimandíbula, gengiva e pênis para análises microscópicas, histomorfométricas, da expressão de IL-6, TNF- α e análise radiográfica.

Resultados: Houve a confirmação de que a periodontite foi induzida no grupo com ligadura, devido ao maior número de osteoclastos, diminuição de osteócitos, maior distância da junção cimento-esmalte à crista óssea, aumento de volume gengival ($p < 0.05$) e intensa reabsorção óssea. Além disso, constatou-se uma concentração média maior de IL-6 nas amostras gengivais e de TNF- α nas amostras penianas nos ratos com ligadura ($p < 0.05$). Não houve diferença estatisticamente significativa nas dimensões ventral-dorsal e látero-lateral do pênis, no entanto verificou-se uma maior espessura e menor área estatisticamente significativa das artérias dorsais penianas no grupo com periodontite experimental, assim como uma menor área dos espaços vasculares dos corpos cavernosos ($p < 0.05$).

Conclusão: A periodontite experimental provocou alterações estruturais e funcionais no pênis de ratos *Wistar*, portanto a inflamação sistêmica causada pela doença periodontal pode ser um importante fator de risco para a disfunção erétil.

Palavras-chave: Doença periodontal; disfunção erétil; disfunção endotelial.

INTRODUÇÃO

A periodontite caracteriza-se por ser uma doença infecciosa crônica, iniciada pelo biofilme microbiano que ocasiona um processo imunoinflamatório nos tecidos do periodonto, o que leva à destruição destes e em alguns casos à consequente perda dos dentes. Vários estudos clínicos e epidemiológicos sugerem que a doença periodontal está associada com um risco aumentado de patologias cardiovasculares¹⁻⁴. Segundo Janket et al.⁵ este risco é 19% maior em um indivíduo que apresenta doença periodontal quando comparado a um saudável, sendo mais proeminente na população abaixo dos 65 anos, na qual o aumento chegou a 44%⁵.

Os mediadores pró-inflamatórios, tais como interleucina-1beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) produzidos localmente nos tecidos gengivais inflamados, podem se dissipar para a circulação e o resultado dessa disseminação tanto de bactérias quanto de mediadores inflamatórios é a promoção de um impacto sistêmico, como a indução da disfunção endotelial, geralmente acompanhada por produção prejudicada de óxido nítrico (NO) pela enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS)^{6,7}. Assim, o estado sistêmico inflamatório, estresse oxidativo e injúrias das células endoteliais constituem o fator fisiopatológico comum entre pacientes com periodontite e doença cardiovascular¹⁻⁴.

Além disso, há uma cocorrência de doença do sistema cardiovascular e disfunção erétil. Recentemente, a ereção disfuncional tem sido reconhecida como uma anormalidade orgânica e fisiológica que afeta a circulação peniana como parte de uma doença vascular generalizada⁸. Portanto, a função erétil prejudicada e a aterosclerose coronariana estão intimamente ligadas, pois ambas são consequências da disfunção endotelial, levando a restrições no fluxo sanguíneo^{9,10}.

Com base nas informações supracitadas, de que a patologia cardiovascular possui relações fisiopatológicas com a periodontite e com a disfunção erétil, sugere-se que a doença periodontal pode estar correlacionada com a dificuldade de ereção. Sustentando-se nos fatos de que os mecanismos patogênicos subjacentes da disfunção endotelial nos corpos cavernosos penianos, parecem colaborar para o início e progressão da disfunção erétil e que a periodontite crônica pode contribuir para o desenvolvimento do distúrbio endotelial, pode haver evidência de que esta correlação seja possível¹¹.

Dessa forma, é razoável inferir que a inflamação sistêmica induzida por patógenos periodontais pode estar associada com a disfunção endotelial e aterosclerose primeiro nos pequenos vasos, como o vascular do pênis, e mais tarde em artérias maiores, tal como as coronárias¹¹. Portanto, com o presente estudo objetivou-se investigar o efeito da periodontite experimental sobre os tecidos periodontais e pênis de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Ratas prenhas da linhagem *Wistar* foram obtidas no Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus Cascavel, e mantidas no biotério setorial do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) e luz (ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro/ 07:00-19:00h). Ao nascimento, os filhotes foram separados por sexo ficando 9 machos para cada ninhada, perfazendo um total de

18 animais, que foram subdivididos em 2 grupos, sendo que todos os animais receberam dieta padrão e água à vontade por todo o período experimental. A amostra foi baseada conforme prévios estudos do grupo de pesquisa, com 9 ratos incluídos em cada grupo¹². Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal e Aulas Práticas (CEEAAP) da UNIOESTE, os quais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Indução da Doença Periodontal

Aos 70 dias de vida, os animais receberam uma ligadura de algodão (Coats Corrente Ltda., SP, Brasil) em torno dos primeiros molares inferiores em uma posição sub marginal para induzir periodontite experimental, de acordo com os métodos propostos por Nassar et al.¹². A anestesia foi obtida pela administração intramuscular de 0,08 ml/100 g de peso corporal de quetamina (Francotar, Virbac do Brasil Ind. E Com. Ltda., São Paulo, SP, Brasil) 0,04 mL/100 g de peso corporal de xilazina (Virbac do Brasil Ind. E Com. Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Após este procedimento originou-se 2 grupos: controle sem ligadura (CON, n=9) e experimental com ligadura (LIG, n=9). Esta ligadura atuou como irritante gengival por 30 dias e favoreceu o acúmulo de placa bacteriana e consequente desenvolvimento da doença periodontal¹².

Sacrifício e Obtenção de Amostras para Análises Imunológicas e Morfológicas

Aos 30 dias de indução da doença periodontal, submeteu-se os ratos dos grupos controle e experimental a jejum de 8 horas, apenas com água à vontade. Em seguida, os ratos foram dessensibilizados com gás carbônico e quando constatada a sedação dos animais, foram decapitados. Nas 18 hemimandíbulas do antímero esquerdo, foi removida a gengiva firmemente presa ao processo alveolar. Também foram coletadas amostras da glândula do pênis dos animais de cada grupo e armazenou-se todos esses tecidos em ependorfs em freezer -80°C, para análise de interleucina-6 e fator de necrose tumoral-alfa. Após isto, a hemimandíbula esquerda foi totalmente dissecada e fixada em solução formol 10%, para posterior análise radiográfica destas. As 18 hemimandíbulas do antímero direito, como também o pênis dos animais de cada grupo foram coletados, reduzidos e fixados em methacarn (70% metanol, 20% clorofórmio e 10% ácido acético glacial) por 24 horas, após foram imersos em solução formol 10%.

Processamento Histológico

Descalcificou-se as hemimandíbulas do antímero direito e o pênis por imersão em ácido tricloroacético (TCA) 5% a 4°C por 27 e 10 dias, respectivamente. As amostras foram avaliadas diariamente a fim de verificar o grau esperado de descalcificação, realizando-se trocas do TCA a cada 5 dias. Após descalcificados, os tecidos foram imersos em sulfato de sódio 5% por 2 horas para neutralizar o TCA, lavados em água corrente (por 2 horas) e mantidos em álcool 70% até o processamento histológico de rotina. Nesse, os tecidos foram desidratados em série alcoólica ascendente, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Purified Paraffin, code 1228, lot 1008459, Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil). Em seguida, seções histológicas de 5 µm de

espessura obtidas em micrótomo manual (Olympus, CUT 4055) foram coradas pela técnica Hematoxilina e Eosina (HE)¹³.

Observações microscópicas

Realizou-se as análises microscópicas por um único examinador, microscópio de luz (Leica Microsystems, Switzerland[®]), por meio da avaliação das secções histológicas coradas. As lâminas foram analisadas para observações morfológicas da gengiva e do processo alveolar das hemimandíbulas, tal como integridade do epitélio, presença de infiltrado inflamatório e características do tecido ósseo, assim como as características morfológicas gerais do pênis dos ratos de todos os grupos.

Histomorfometria da Gengiva

Realizou-se as medidas histomorfométricas nas gengivas marginais vestibular e lingual direita em todos os grupos, por meio de um programa analisador de imagens (Software LAS V.4.2 – Leica Microsystems[®]) acoplado a um microscópio de luz com objetiva de 40x, a intervalos de 10 cortes entre uma contagem e outra no seriamento dos cortes (cerca de 50 µm). As mensurações foram feitas a partir de pontos morfológicos pré-determinados na gengiva marginal, como ilustrado na figura 1. Os resultados foram expressos em milímetros.

Histomorfometria do Osso

Foi realizada a quantificação de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos presentes em cinco campos consecutivos do osso alveolar partindo do ponto mais alto da crista óssea. Para a observação, utilizou-se o aumento de 400 vezes no microscópio de luz (Leica Microsystems, Switzerland[®]). Foram feitas duas observações por campo e então, calculada a média dos valores para cada grupo.

A medida da crista óssea alveolar foi realizada por meio de um microscópio (Leica Microsystems, Switzerland[®]) acoplado a um computador, o qual permitiu capturar as imagens com auxílio do software LAS V.4.2[®]. Realizou-se uma medida da menor distância entre o ápice da crista óssea alveolar vestibular e a junção cimento-esmalte. As medidas foram repetidas duas vezes por dia, em três dias diferentes e então, calculada a média entre os valores.

Análise Radiográfica

A hemimandíbula do lado esquerdo de cada animal, fixada em formol tamponado (pH 7,2) durante 48 horas, foi submetida à análise radiográfica. Para isto, as hemimandíbulas foram colocadas com o lado lingual sobre o filme radiográfico periapical (AGFA DENTUS[®], Ultraspeed) e posicionadas de modo que as cúspides vestibular e lingual dos primeiros molares ficassem no mesmo plano vertical. Utilizou-se o aparelho de raio X GE – 1000, regulado para 15mA, 65Vp, 18 impulsos, distância foco/filme de 50 centímetros com incidência de raios X perpendicular às peças. Para processamento dos filmes, foi utilizado revelador e fixador Kodak[®] no respectivo processamento de tempo/temperatura e digitalizadas por meio de um "scanner" para dispositivos (Polaroid Sprint Scan 35 Plus, Polaroid). As imagens digitalizadas foram analisadas em 3 medidas no programa Image Tools 3.0 e retiradas uma média entre elas, por meio de uma medida linear, que percorreu a distância da junção cimento-esmalte até a crista

óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior esquerdo do rato, com as medições em pixels¹⁴.

Análise da Expressão da IL-6 e do TNF- α

A gengiva ao redor dos primeiros molares inferiores da hemimandíbula do lado esquerdo, submetidos ou não a colocação de ligadura, foram destinadas à análise por Ensaio de Imunoabsorção Acoplado a Enzimas (ELISA) da presença da citocina IL-6. Da mesma forma, uma porção da glândula do pênis dos ratos de todos os grupos obtidas no momento do sacrifício, foram submetidas à análise, por ELISA, da presença da citocina TNF- α .

O total de proteínas foi extraído das amostras de gengiva e pênis por meio de um tampão de extração a base de detergente com um coquetel de inibidor de protease. Após, foi realizada a quantificação das proteínas pelo método de Bradford.

Análises Histomorfométricas do pênis

Realizou-se as análises histomorfométricas em secções transversais (5 μ m) para obtenção das dimensões ventral-dorsal (VD) e látero-lateral (LL), em aumento de 40x; também, mensurou-se a área dos espaços vasculares dos corpos cavernosos, bem como a área luminal e espessura da parede da artéria dorsal direita do pênis em aumento de 100x. As análises foram realizadas em microscópio (Leica Microsystems, Switzerland[®]) acoplado a um computador, o qual permitiu capturar as imagens e fazer as mensurações por meio do software LAS V.4.2[®] (Figura 2).

Para a análise estatística, todos os valores numéricos foram expressos como média \pm desvio padrão. Após a verificação da distribuição de normalidade dos dados, por meio do programa Bioestat 5.3 (Instituto Mamirauá, Amazonas, Brasil), foi realizado o teste T de Student com $p < 0,05$ para avaliar a diferença entre os grupos.

RESULTADOS

Análise Descritiva Morfológica - Hemimandíbula

A figura 3A é representativa do grupo controle. Observou-se que os tecidos gengivais, epitélio sulcular, epitélio juncional e o tecido conjuntivo subjacente na região do primeiro molar mostraram características normais. Não foi percebido processo inflamatório nos tecidos. O osso alveolar apresentou integridade, era compacto, regular, com a porção esponjosa central de aparência normal. A crista óssea alveolar mostrou espessura mediana e altura ao nível do terço cervical da raiz. Além disso, não foi verificada uma expressiva atividade de osteoclastos. Observou-se o aparecimento de linhas incrementais, organização de alguns canais de Havers e a presença de osteoblastos alinhados adjacentes à crista óssea, o que revelou a existência de atividade de formação óssea em todos os grupos. Foi verificado também que a junção cimento-esmalte e o ligamento periodontal estavam com características normais. Em alguns casos se observou que o cimento estava espessado no terço apical, o que sugere hiper cementose local.

A figura 3B representa o grupo com periodontite induzida. O epitélio juncional apresentou uma migração apical e um discreto infiltrado inflamatório

em tecido conjuntivo. Observou-se também, uma intensa reabsorção óssea. Desse modo, o processo alveolar apresentou-se compacto com área central esponjosa, no entanto, com cristas ósseas cônicas e baixas, fazendo com que houvesse exposição do terço cervical. Expressiva atividade osteoclástica foi observada nestas áreas, como mostra a figura 4. Verificou-se neoformação óssea, evidenciado por linhas incrementais na região do ligamento periodontal adjacente ao osso alveolar em algumas regiões. Além disso, constatou-se que o cimento estava espessado no terço apical, o que sugere hiperementose local.

- Pênis

A figura 2 é representativa da organização geral, em secção transversal, de pênis de rato. No grupo controle, observou-se três corpos cilíndricos e eréteis (um par de corpos cavernosos e o corpo esponjoso). Os corpos cavernosos consistiam em numerosos espaços vasculares (seios cavernosos), separados por trabéculas, revestidos por células endoteliais e fibras musculares lisas restritas à região subendotelial. Verificou-se que as trabéculas dos corpos cavernosos eram constituídas por tecido conjuntivo, contendo fibroblastos dispersos e uma densa matriz extracelular que continha, principalmente, proteínas fibrilares, tais como colágenas e elásticas. O corpo esponjoso abrigava no seu interior a uretra. Todas estas estruturas estavam envolvidas por uma camada de tecido conjuntivo fibroso, a túnica albugínea. Foi observado também a veia dorsal profunda e artéria dorsal, além de ramos do nervo dorsal do pênis. A figura 5B representa a secção transversal de um grupo com periodontite experimental. Observou-se, além da organização típica, que as trabéculas eram, aparentemente, maiores e foi verificada a presença de espaços vasculares mais estreitos, quando comparado ao observado em animais do grupo controle (Figura 5A).

Histomorfometria da Gengiva

A tabela 1 mostrou que a altura do epitélio da crista gengival foi significativamente maior no grupo com periodontite experimental, aproximadamente 26%. Da mesma forma, houve diferença significativa em relação à largura do epitélio bucal, que para o grupo com periodontite induzida foi 25% maior. A altura do tecido conjuntivo na região média, nos ratos com ligadura, mostrou um aumento de 72% em relação ao grupo controle, sendo estas diferenças estatisticamente significativas. Do mesmo modo, o grupo com periodontite experimental revelou um aumento na largura do tecido conjuntivo na região basal de 82% quando comparado com o grupo controle.

Histomorfometria do osso

A tabela 2 demonstrou que o osso alveolar mandibular que circunda o primeiro molar direito apresentou maior quantidade de osteoclastos estatisticamente significante no grupo com periodontite experimental. Já o número de osteócitos foi significativamente maior no grupo controle. Quanto à contagem de osteoblastos, não foi observado diferenças significativas entre os grupos.

Análise histomorfométrica e radiográfica da distância entre o ápice da crista óssea alveolar vestibular e a junção cimento-esmalte

A tabela 3 revelou que a análise histomorfométrica no grupo com periodontite experimental apresentou um aumento desta distância de 75% quando comparado com o grupo controle, o que indica que a periodontite

provocou uma maior perda óssea alveolar. A análise radiográfica do primeiro molar inferior demonstrou que no grupo com periodontite experimental houve maior perda óssea alveolar significativa em relação ao grupo controle ($p < 0.05$), o que evidencia a ação da periodontite induzida sobre o tecido ósseo alveolar.

Análise da presença da citocina IL-6 nas amostras gengivais e da citocina TNF- α nas amostras de pênis

Na tabela 4, observa-se que a IL-6 apresentou concentração média maior no grupo com periodontite experimental, ou seja, houve um aumento significativo dessa citocina nos ratos com periodontite induzida, o que comprova sua maior produção quando da presença de uma inflamação crônica. Os resultados mostraram também uma maior concentração da citocina TNF- α estatisticamente significativa nas amostras penianas dos ratos com periodontite induzida, quando comparado com o grupo controle.

Análise das dimensões, da artéria dorsal do pênis e área dos espaços vasculares dos corpos cavernosos

Os resultados da tabela 5 revelaram que não houve diferença estatisticamente significativa tanto na dimensão ventral-dorsal quanto na látero-lateral entre os grupos. A tabela 5 mostrou também que o grupo com periodontite experimental apresentou uma maior espessura da parede e menor área da artéria dorsal do pênis quando comparado com o grupo controle. Quanto à área dos espaços vasculares, no grupo controle foi significativamente maior quando comparado com o grupo com periodontite induzida.

DISCUSSÃO

A doença periodontal é uma condição inflamatória causada pelo biofilme bacteriano que produz infecção e destruição dos tecidos de suporte periodontais e posterior perda dos dentes¹⁵. A periodontite é uma das doenças crônicas inflamatórias mais comuns do mundo. A prevalência das formas leve e moderada varia de 20 a 50%, o que pode chegar a 85% na população mais idosa¹⁶. As formas graves comprometem 30% dos adultos acima de 50 anos^{17,18}.

A infecção periodontal pode promover um efeito negativo sobre o estado de saúde sistêmica do organismo. A periodontite está associada com doenças sistêmicas, tal como, doença cardíaca coronária, doença cerebrovascular, diabetes, doença pulmonar obstrutiva crônica e com a disfunção endotelial, sendo esta última a ligação fisiopatológica entre a doença periodontal e a disfunção erétil¹⁹⁻²¹.

Neste estudo, os ratos com ligadura apresentaram características típicas de periodontite, como observado pelo maior número de osteoclastos e diminuição de osteócitos em comparação com o grupo controle (Tabela 2). Segundo Spolidorio et al.²², o aumento do número de osteoclastos está associado com a reabsorção do osso e ainda de acordo com Kurikchy et al.²³, uma maior quantidade de osteócitos indica maturidade, logo sugere-se que a colocação da ligadura gerou perda óssea do alvéolo. Além disso, há uma relação positiva entre o número de osteoclastos ativos na superfície óssea e a distância junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar. Esta pode ser utilizada como um ponto de partida para diagnosticar a altura do osso alveolar, pois medindo-se a distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar, é possível estimar se existe ou não perda óssea²³. A mensuração desta distância foi

significativamente maior no grupo experimental, assim fica evidente que a perda óssea alveolar foi induzida pelo uso da ligadura. Os resultados da análise radiográfica da altura da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar consolida esta hipótese, visto que essa medida também foi maior radiograficamente neste grupo (Tabela 3).

A avaliação microscópica descritiva dos cortes histológicos do grupo com periodontite revelou alterações no epitélio juncional e atividade de reabsorção osteoclástica, ou seja, características morfológicas típicas de periodontite, colaborada com os resultados demonstrados na análise histomorfométrica do osso alveolar (Tabela 2). Ainda no grupo com periodontite experimental, a altura e espessura gengival mostrou-se maior estatisticamente significativa, caracterizando dessa forma não somente alterações histopatológicas, mas também um aumento de volume gengival, típico na presença de periodontite, devido à existência do biofilme bacteriano (Tabela 1). Com base nesses resultados, podemos afirmar que o modelo deste estudo cumpriu com os requisitos experimentais de periodontite, dessa forma, é possível investigar o efeito desta nas estruturas do pênis.

Diversos mecanismos podem estar envolvidos na ereção peniana, a qual é determinada por mudanças de pressão nos seios cavernosos. Na ausência de estímulos de excitação, a vasoconstrição cavernosa mantém o pênis no estado não ereto. A contração do músculo liso cavernoso, principalmente em resposta à norepinefrina liberada das terminações nervosas simpáticas, estreita o lúmen arteriolar e as cavidades sinusoidais, restringindo o fluxo de sangue para manter baixa pressão intracavernosa e um pênis sem ereção (flácido). Durante a excitação sexual ou tumescência noturna, ocorre a liberação de óxido nítrico (NO), predominantemente por meio da ativação da enzima óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) nos nervos não adrenérgico não colinérgico e da enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) nas células endoteliais locais. O NO estimula a enzima guanilato ciclase que, em seguida, converte o GTP em GMPc, induzindo um aumento substancial deste dentro da célula, o que causa o relaxamento do músculo liso, e resulta na dilatação das arteríolas e dos seios cavernosos, ocorrendo assim um aumento do fluxo sanguíneo (impulsionado pela força da pressão arterial média) e um subsequente aumento da pressão intracavernosa. A resposta erétil, devido à pressão elevada expande a túnica albugínea, resultando no aumento do comprimento e diâmetro do pênis, característico da ereção²⁴⁻²⁶. Logo, percebe-se que a ereção depende essencialmente da produção de NO pelo endotélio vascular e para que isso ocorra, é essencial que se tenha uma função normal do endotélio. A disfunção endotelial é definida como uma alteração do relaxamento vascular por diminuição da biodisponibilidade de fatores de relaxamento derivados do endotélio, principalmente o NO^{27,28}.

A periodontite crônica está associada a um aumento de espécies reativas de oxigênio, processo denominado estresse oxidativo^{29,30}. O excesso de produção destas espécies conduz a um aumento da inativação de NO, e os danos no sistema antioxidante podem contribuir para a disfunção endotelial em pacientes com periodontite³¹. Além disso, as concentrações elevadas de mediadores inflamatórios tais como o TNF- α , IL-6, interleucina-8 (IL-8) e interleucina-18 (IL-18) podem estar associadas com um risco aumentado de disfunção endotelial,^{32,33} já que estas citocinas reduzem a biodisponibilidade do NO em células endoteliais e impedem a vasodilatação endotélio-dependente.

Os resultados deste estudo demonstraram que a concentração da citocina IL-6 nas amostras gengivais do grupo com periodontite experimental, estava significativamente aumentada quando comparada com o grupo controle (Tabela 4). Outro estudo que também revela uma maior concentração de marcadores inflamatórios nos animais com doença periodontal crônica é o de Zuo et al.³⁴, o qual revelou que as concentrações séricas de PCR e TNF- α estavam mais elevadas no grupo com periodontite. No presente estudo, o grupo com periodontite induzida também apresentou uma expressão de TNF- α aumentada nas amostras penianas, sugerindo-se então, que essas concentrações aumentadas possam contribuir para a disfunção endotelial (Tabela 4).

Dessa forma, a doença periodontal pode, direta ou indiretamente, inibir a expressão e atividade da eNOS pela produção de citocinas, como TNF- α e IL-6. Isso pode ser confirmado pelo estudo de Zuo et al.³⁴, na qual a periodontite induzida experimentalmente, resultou na ereção peniana prejudicada e diminuição da expressão proteica da eNOS nos corpos cavernosos dos ratos. De forma similar, o estudo de Andrukhov et al.³⁵ demonstrou que pacientes com periodontite apresentaram concentração significativamente mais baixas de metabólitos do NO em comparação com o grupo controle e concluiu que a produção de NO estava reduzida em pacientes com periodontite, especialmente na população masculina. Os autores³⁵ sugeriram que esta diminuição do NO no gênero masculino poderia explicar a associação entre a periodontite e a disfunção erétil. Com base nesses estudos,^{34,35} aventa-se a hipótese que a periodontite, conhecida por induzir a disfunção endotelial, cause disfunção erétil por diminuir a atividade da enzima óxido nítrico sintetase nos corpos cavernosos, o que resulta na redução da produção de NO e conseqüente diminuição da atividade do cGMP, inibindo assim o relaxamento dependente do endotélio do músculo liso do corpo cavernoso.

Este estudo avaliou, ainda, o efeito da periodontite sobre a estrutura do pênis. A ereção do pênis é um fenômeno neurovascular que envolve aumento do influxo arterial, relaxamento do músculo liso subendotelial e diminuição da efusão de sangue dos espaços vasculares (veno-oclusão dos espaços cavernosos). Qualquer alteração desses componentes hemodinâmicos ou da interação da via nervosa pode causar disfunção erétil³⁶. Na análise morfológica realizada, pode-se constatar que a alteração estrutural mais marcante no grupo experimental foi vascular, com espessamento da parede e concomitante diminuição da área luminal das artérias dorsais do pênis (Tabela 5) logo, sugere-se que possa haver um aumento da resistência à saída de sangue da artéria, o que causa isquemia tecidual local e fibrose, prejudicando a função erétil por interferir na veno-oclusão. Villalba et al.³⁷ observaram alterações estruturais e funcionais em artérias penianas de ratos Zucker obesos, nas quais ocorreram espessamento da túnica média e diminuição do diâmetro das artérias penianas, o que sugere remodelação vascular interna; nestes animais, também foram relatadas alterações funcionais, tais como reatividade vascular anormal e disfunção endotelial. Segundo estes autores³⁷, alterações estruturais nas artérias penianas podem explicar a disfunção erétil relatada em ratos Zucker obesos.

Além disso, a análise descritiva morfológica do pênis, no grupo com periodontite experimental do presente estudo, revelou que as trabéculas dos corpos cavernosos estavam aparentemente maiores e com espaços vasculares mais estreitos (Tabela 5), o que possibilita inferir que estes espaços sejam incapazes de reter sangue com conseqüente diminuição do afluxo, essencial para

e elevar a pressão no interior do pênis e causar a ereção. Segundo Jiang et al.³⁸, a hiperplasia da fibra colágena intersticial das trabéculas pode resultar na redução do contato célula a célula. Essa comunicação intercelular por meio deste contato é o principal modulador do tônus da musculatura lisa dos corpos cavernosos. A sua diminuição pode restringir a liberação de neurotransmissores que participam da modulação do tônus do músculo liso para causar o relaxamento sinusoidal e desenvolvimento da ereção. Dessa forma, propõe-se que os animais do grupo experimental desse estudo possam apresentar alterações fisiológicas nos mecanismos de ereção devido ao possível aumento da matriz extracelular das trabéculas dos corpos cavernosos (Figura 5B).

CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo forneceram evidências de que a doença periodontal pode estar associada com a disfunção erétil. Primeiramente, porque o grupo experimental apresentou maiores concentrações de IL-6 na gengiva e de TNF- α no pênis e as concentrações elevadas desses mediadores inflamatórios podem induzir a disfunção endotelial e prejudicar a ereção. Em segundo lugar, este estudo demonstrou alterações histopatológicas importantes no pênis de ratos com periodontite induzida experimentalmente, como alterações funcionais e estruturais nas artérias penianas que pode ter sido causada pela disfunção endotelial crônica promovida pela doença periodontal, e uma menor área dos espaços vasculares no grupo com ligadura, o que sugere diminuição na pressão intracavernosa, essencial para a ereção do pênis. Diante desse impacto que a doença periodontal pode provocar tanto na função erétil quanto na estrutura do pênis, a prevenção desta doença pode ser eficaz na redução da incidência da disfunção erétil.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, fundação Araucária e a Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) pelo suporte financeiro. Nós também agradecemos aos Laboratórios de Fisiologia Endócrina e Metabolismo e de Biologia Celular da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) pelo apoio estrutural. Os autores são extremamente agradecidos a Celeste da Rocha Paiva, técnica do Laboratório de Biologia Celular, pela assistência técnica na realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

- 1-** Friedewald VE, Kornman KS, Beck JD, Genco R, Goldfine A, Libby P, Offenbacher S, Ridker PM, van Dyke TE, Roberts WC. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology editors' consensus: periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *Journal of Periodontology* 2009; 80: 1021–1032.
- 2-** Kebschull M, Demmer RT, Papapanou PN. "Gum bug, leave my heart alone!"—epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *Journal of Dental Research* 2010; 89: 879–902.
- 3-** Schenkein HA, Loss BG. Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. *J. Clin. Periodontol.* 2013; 40: 51–69.
- 4-** Tonetti MS, Van Dyke TE. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *Journal of Clinical Periodontology* 2013; 40: 24–29.

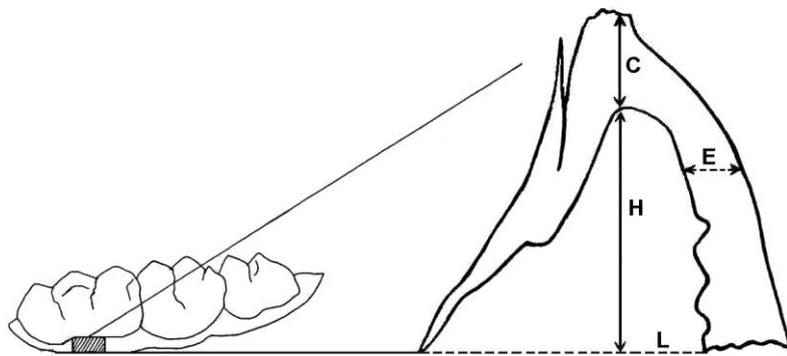
- 5-** Janket SJ, Baird AE, Chuang SK, Jones JA. Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95: 559-569.
- 6-** Amar S, Gokce N, Morgan S, Loukideli M, Van Dyke TE, Vita JA. Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2003; 23: 1245-1249.
- 7-** Elter JR, Hinderliter AL, Offenbacher S, Beck JD, Caughey M, Brodala N, Mad-Ianos PN. The effects of periodontal therapy on vascular endothelial function: a pilot trial. *American Heart Journal* 2006; 151: 47.
- 8-** Johannes CB, Araujo AB, Feldman HA, Derby CA, Kleinman KP, Mckinlay JB. Incidence of erectile dysfunction in men 40 to 69 years old: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J. Urology*. 2000; 163: 460-463.
- 9-** Chiurlia E, D'Amico R, Rratti C, Granata AR, Romagnoli R, Modena MG. Subclinical coronary artery atherosclerosis in patients with erectile dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005; 46: 1503-1506.
- 10-** Vlachopoulos C, Rokkas K, Ioakeimidis N, Stefanadis C. Inflammation, metabolic syndrome, erectile dysfunction, and coronary artery disease: common links. *Eur. Urol.* 2007; 52: 1590-600.
- 11-** Zadik Y, Bechor R, Galor S, Justo D, Heruti RJ. Erectile dysfunction might be associated with chronic periodontal disease: Two ends of the cardiovascular spectrum. *J. Sex. Med.* 2009; 6: 1111-1116.
- 12-** Nassar PO, Nassar CA, Guimarães MR, Aquino SG, Andia DC, Muscara MN, Spolidorio DM, Rossa CJr, Spolidorio LC. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *J. Periodontal. Res.* 2009; 44: 479-488.
- 13-** Junqueira LC, Junqueira LMMS. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. Santos, São Paulo: 1983.
- 14-** Nassar CA, Battistetti GD, Nahsan FP, Olegário J, Marconato J, Marin CF, Faccioni DM, da Costa KF, Kottwitz LB, Nassar PO. Evaluation of the effect of simvastatin on the progression of alveolar bone loss in experimental periodontitis-an animal study. *J Int Acad Periodontol* 2014; 6: 2-7.
- 15-** Piconi S, Trabattoni D, Luraghi C, Perilli E, Borelli M, Pacci M, Rizzardini G, Lattuada A, Bray DH, Catalano M, Sparaco A, Clerici M. Treatment of periodontal disease results in improvements in endothelial dysfunction and reduction of the carotid intima-media thickness. *FASEB J*, 2009; 23: 1196-204.
- 16-** Balan H. Do cardio-vascular and periodontal diseases have a close, causal relationship? *Rom J Intern Med* 2010; 48: 121-129.
- 17-** Paizan MLM., J.F.V. Association between periodntal disease and hypertension. *Rev Bras Hipertens* 2009; 16: 183-185.
- 18-** Ramirez JH, Arce RM, Contreras A. Periodontal treatment effects on endothelial function and cardiovascular disease biomarkers in subjects with chronic periodontitis: protocol for a randomized clinical trial. *Trials* 2011; 12: 46.
- 19-** Gulati M, Anand V, Jain N, Anand B, Bahuguna R, Govila V, Rastogi P. Essentials of periodontal medicine in preventive medicine. *Int. J. Prev. Med* 2013; 4: 988-994
- 20-** Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Quagliaro L, Piconi L, Bais B, Da Ros R, Motz E. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation* 2002; 106: 1211-1218.

- 21-** Aversa A, Bruzziches R, Francomano D, Natali M, Gareri P, Spera G. Endothelial dysfunction and erectile dysfunction in the aging man. *Int. J. Urol.* 2010; 17: 38-47.
- 22-** Spolidorio LC, Nassar PO, Nassar CA, Spolidorio DMP, Muscará MN. Conversion of Immunosuppressive Monotherapy from Cyclosporin A to Tacrolimus Reverses Bone Loss in Rats. *Calcified tissue international* 2007; 81:114-123.
- 23-** Kurikchy MQ, Al-Rawi NH, Ayoub RS, Mohammed SS. Histological evaluation of bone healing using organic bovine bone in combination with platelet-rich plasma (an experimental study on rabbits). *Clinical Oral Investigations* 2013; 17: 897-904.
- 24-** Andersson KE. Pharmacology of penile erection. *Pharmacol. Rev.* 2001; 53: 417-450.
- 25-** Andersson KE, Stief CG. Neurotransmission and the contraction and relaxation of penile erectile tissues. *World J. Urol.* 1997; 15: 14-20.
- 26-** Burnett AL. Role of nitric oxide in the physiology of erection. *Biol. Reprod.* 1995; 52: 485-489.
- 27-** Gimbrone MA Jr, Cybulsky MI, Kume N, Collins T, Resnick N. Vascular endothelium. An integrator of pathophysiological stimuli in atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995; 748: 122-131.
- 28-** Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809.
- 29-** Dijkhorst-Oei LT, Stores ES, Koomans HA, Rabelink TJ. Acute simultaneous stimulation of nitric oxide and oxygen radicals by angiotensin II in humans in vivo. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999; 33: 420-424.
- 30-** Higashi Y, Sasaki S, Nakagawa K, Matsuura H, Oshima T, Chayama K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346: 1954-1962.
- 31-** Higashi Y, Goto C, Jitsuiki D, Umemura T, Nishioka K, Hidaka T, Takemoto H, Nakamura S, Soga J, Chayama K, Yoshizumi M, Taguchi A. Periodontal infection is associated with endothelial dysfunction in healthy subjects and hypertensive patients. *Hypertension* 2008; 51: 446-453.
- 32-** Eaton CB, Liu YL, Mittleman MA, Miner M, Glasser DB, Rimm EB. A retrospective study of the relationship between biomarkers of atherosclerosis and erectile dysfunction in 988 men. *Int. J. Impot. Res.* 2007; 19: 218-225.
- 33-** Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Ioakeimidis N, Rokkas K, Vasiliadou C, Alexopoulos N, Stefanadi E, Askitis A, Stefanadis C. Unfavourable endothelial and inflammatory state in erectile dysfunction patients with or without coronary artery disease. *Eur. Heart J.* 2006; 27: 2640-2648.
- 34-** Zuo Z, Jiang J, Jiang R, Chen F, Liu J, Yang H, Cheng Y. Effect of Periodontitis on Erectile Function and Its Possible Mechanism. *J. Sex. Med.* 2011; 8: 2598-2605.
- 35-** Andrukhov O, Haririan H, Bertl K, Rausch WD, Bantleon HP, Moritz A, Rausch-Fan X. Nitric oxide production, systemic inflammation and lipid metabolism in periodontitis patients: possible gender aspect. *J Clin Periodontol* 2013; 40: 916-923.
- 36-** Wespes, E. Smooth muscle pathology and erectile dysfunction. *Int. J. Impot. Res.* 2002; 14: 17-21.
- 37-** Villalba N, Martínez P, Briones AM, Sánchez A, Salaíces M, García-Sacristán A, Hernández M, Benedito S, Prieto D. Differential structural and functional

changes in penile and coronary arteries from obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297: 696–707.

38- Jiang R, Chen JH, Jin J, Shen W, Li QM. Ultrastructural comparison of penile cavernous tissue between hypertensive and normotensive rats. *International Journal of Impotence Research* 2005; 17: 417–423.

LEGENDAS DE FIGURAS



C - altura do epitélio da crista gengival

E - largura do epitélio bucal

H - altura do tecido conjuntivo na região média

L - largura do tecido conjuntivo na região basal

Figura 1. Esquema da gengiva marginal do rato, mostrando os pontos de referência usados para as medidas morfométricas do epitélio bucal, crista epitelial e tecido conjuntivo.

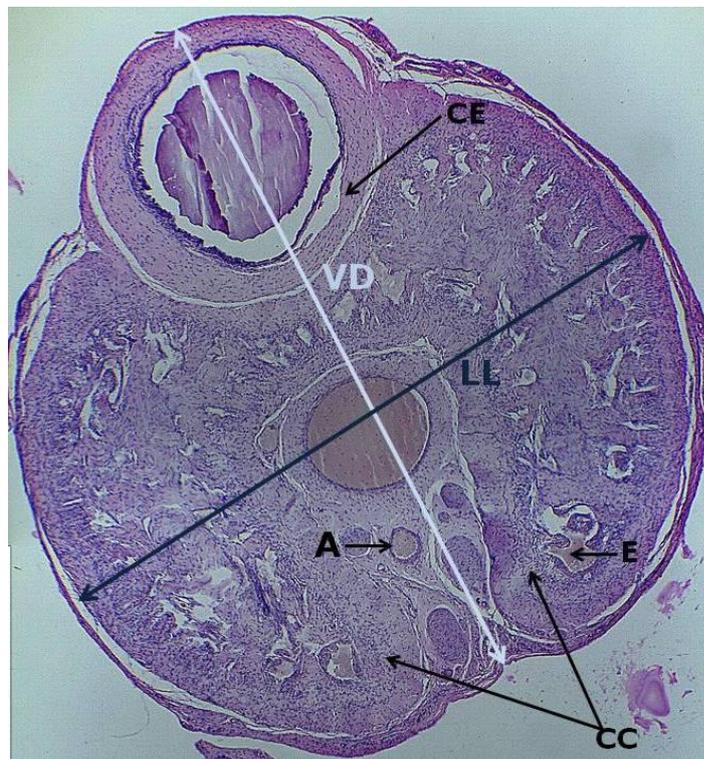


Figura 2. Fotomicrografia representativa da organização geral e da análise das dimensões, em secção transversal, de pênis de rato. São indicados: VD,

dimensão ventral-dorsal; LL, dimensão látero-lateral; E, espaço vascular; A, artéria dorsal do pênis; CE, corpo esponjoso; CC, corpo cavernoso. Hematoxilina e Eosina, 40x.

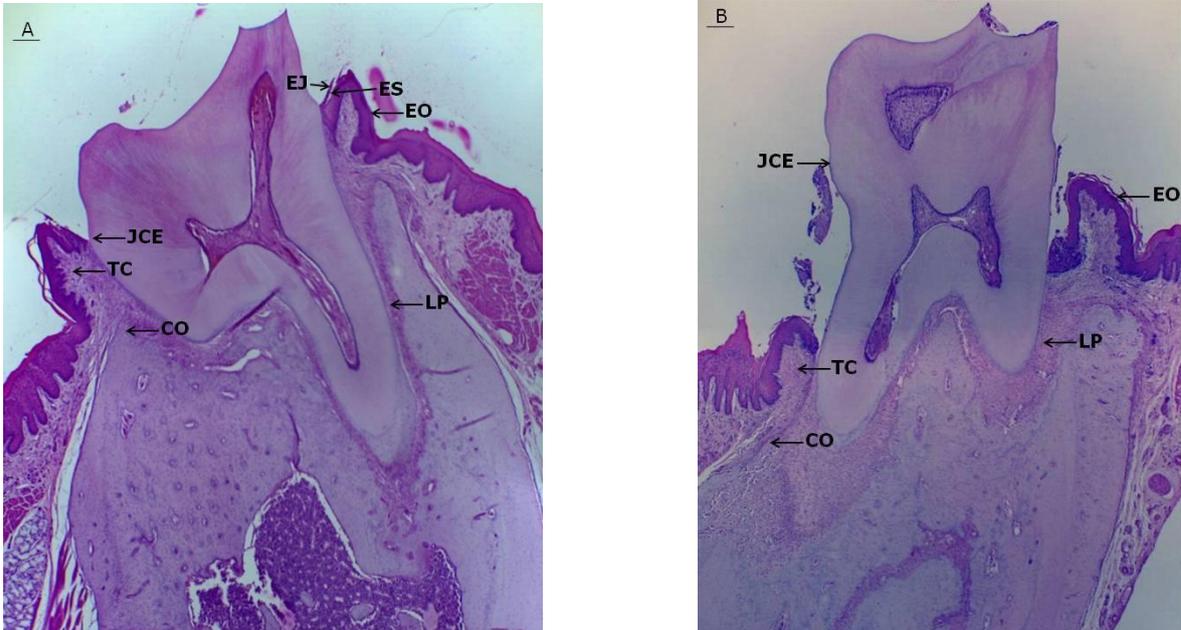


Figura 3. Fotomicrografias representativas de secção sagital do primeiro molar mandibular direito de um animal do grupo controle (A) e um animal do grupo experimental (B). São indicados: EJ, epitélio juncional; ES, epitélio sulcular; EO, epitélio oral; LP, ligamento periodontal; JCE, junção cimento-esmalte; TC, tecido conjuntivo; CO, crista óssea alveolar. Hematoxilina e Eosina, 40x.

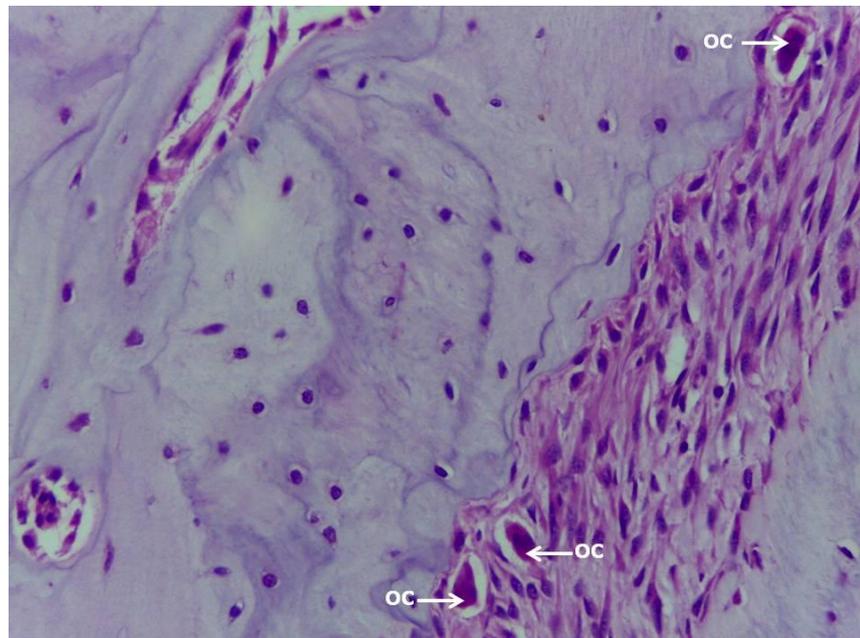


Figura 4. Fotomicrografia representativa das evidências de reabsorção óssea do osso alveolar mandibular que circunda o primeiro molar direito de um rato do grupo experimental. OC, osteoclasto. Hematoxilina e Eosina, 400x.

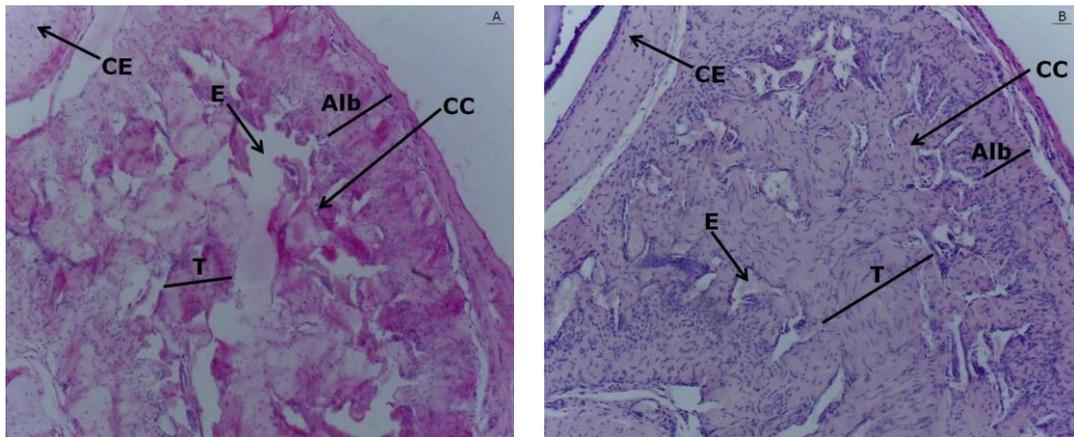


Figura 5. Fotomicrografias representativas de secção transversal de pênis de um animal do grupo controle (A) e um animal do grupo experimental (B). São indicados: CE, corpo esponjoso; CC, corpo cavernoso; E, espaço vascular; T, trabécula; Alb, túnica albugínea. Hematoxilina e Eosina, 100x.

TABELAS

Tabela 1. Análise histomorfométrica da gengiva da hemimandíbula direita dos ratos dos grupos estabelecidos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em mm.

Grupos	C	E	H	L
CONTROLE	0.0832 ± 0.0114	0.067 ± 0.0073	0.230 ± 0.0548	0.125 ± 0.033
EXPERIMENTAL	0.1051 $\pm 0.0186^*$	0.084 $\pm 0.0130^*$	0.396 $\pm 0.1249^*$	0.228 $\pm 0.067^*$

* Estatisticamente significativa dentro do mesmo parâmetro, com $p < 0.05$.

Tabela 2. Análise histomorfométrica da hemimandíbula direita dos ratos dos grupos estabelecidos para quantificação de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em unidades.

Grupos	Osteoblastos	Osteócitos	Osteoclastos
CONTROLE	10.600 ± 6.557	37.833 ± 11.570	0.033 ± 0.182
EXPERIMENTAL	10.333 ± 6.249	25.633 $\pm 10.420^*$	0.800 $\pm 1.063^*$

* Estatisticamente significativa dentro do mesmo parâmetro, com $p < 0.05$.

Tabela 3. Análise histomorfométrica do primeiro molar inferior direito dos ratos e análise radiográfica do lado mesial do primeiro molar inferior esquerdo dos ratos da distância junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do grupo controle e experimental. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em mm para a análise histomorfométrica e em pixels para a análise radiográfica.

Grupos	Análise Histomorfométrica	Análise Radiográfica
CONTROLE	0,690 $\pm 0,233$	57.07 ± 9.67
EXPERIMENTAL	1.206 $\pm 0,620^*$	93.43 $\pm 5.51^*$

* Estatisticamente significativa dentro do mesmo parâmetro, com $p < 0.05$.

Tabela 4. Análise das concentrações da citocina IL-6 nas amostras gengivais e da citocina TNF- α nas amostras de pênis dos ratos no grupo controle e experimental. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em pg/ml.

Grupos	Gengiva (IL-6)	Pênis (TNF- α)
CONTROLE	26.56 ± 13.16	1.57 ± 0.40
EXPERIMENTAL	50.65 $\pm 20.92^*$	5.35 $\pm 0.32^*$

* Estatisticamente significativa dentro do mesmo parâmetro, com $p < 0.05$.

Tabela 5. Valores das dimensões ventral-dorsal e látero-lateral de secções transversais do pênis, da espessura da parede e área da artéria dorsal do pênis e da área dos espaços vasculares dos corpos cavernosos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em mm para dimensões ventral-dorsal e látero-lateral de secções transversais do pênis e da espessura da parede e em mm² para área da artéria dorsal do pênis e área dos espaços vasculares dos corpos cavernosos, respectivamente.

Grupos	Dimensão Ventral-dorsal (pênis)	Dimensão Látero-lateral (pênis)	Espessura da parede da artéria dorsal (pênis)	Área Artéria Dorsal (pênis)	Área espaços vasculares (corpos cavernosos)
CONTROLE	3.279 ± 0.8354	3.378 ± 0.6365	0,0169 $\pm 0,004$	0,007 $\pm 0,0008$	0.0140 ± 0.0058
EXPERIMENTAL	2.845 ± 0.3984	3.079 ± 0.1627	0,0201 $\pm 0,004 *$	0,004 $\pm 0,0007*$	0.0071 $\pm 0.0014 *$

* Estatisticamente significativa dentro do mesmo parâmetro, com $p < 0.05$. Sem o símbolo * os valores são estatisticamente semelhantes, com $p > 0.05$.

5.1 ANEXO B: Normas da Revista Científica

Journal of Periodontology

Instructions to Authors

CONTENT

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

MANUSCRIPT CATEGORIES AND SPECIFIC FORMATS

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

ORIGINAL ARTICLES

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

Format

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

Abstract

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

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

Introduction

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

Materials and Methods

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

Results

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

Discussion

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

MANUSCRIPT SUBMISSION, PREPARATION, AND FORMAT

The Journal of Periodontology accepts manuscript submissions online at: <http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>.

Authors should prepare manuscripts in accordance with both the instructions below and the preceding instructions provided for each manuscript category.

Detailed instructions for online submission are described under “Web Uploading Policies and Instructions.”

Inquiries regarding current submissions should be sent to: Managing Editor, Journal of Periodontology, 737 North Michigan Avenue, Suite 800, Chicago, IL 60611-6660. Telephone: 312/573-3224; e-mail: julie@perio.org.

SUBMISSION

Authorship

Individuals identified as authors must meet the following criteria established by the International Committee of Medical Journal Editors: 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and 3) final approval of the version to be published.

Once the Journal has received a manuscript, any changes in authorship must be faxed to the editorial office at 312/573-3225 (attn: Jerry Eberle, Editorial Coordinator) or e-mailed to jerry@perio.org and must contain the signature of the author who has been added or removed from the paper. Authors who are added must submit a conflict of interest and financial disclosure form (described under “Acknowledgments and Conflicts of Interest”).

Conflict of Interest and Financial Disclosure Forms

A conflict of interest and financial disclosure form must be submitted for each author. The form can be found on Scholar One Manuscripts (<http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>) in the upper right-hand corner under "Instructions & Forms." More information on conflicts of interest can be found under "Conflicts of Interest" below.

PREPARATION

Style

Please follow the guidelines below when preparing the manuscript:

- * Be sure to put the genus and species of an organism and journal names in the reference section in italics.
- * The Journal of Periodontology does not italicize common Latin terms such as *in vitro*, *in vivo*, e.g., or i.e.
- * Use a block style; do not tabulate or indent material.
- * Refer to the 4th edition of the Glossary of Periodontal Terms published by the American Academy of Periodontology for preferred terminology.
- * Authors are encouraged to use the disease classification as outlined in the Annals of Periodontology, volume 4 (1999 International Work-shop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions).

FORMAT

Manuscripts must be submitted in Microsoft Word.

Margins should be at least 1" on both sides and top and bottom. Materials should appear in the following order:

Title Page

Abstract (or Introduction) and Key Words

Text

Footnotes

Acknowledgment(s)

References

Figure Legends

Tables

Figures should not be embedded in the manuscript. Please see the Journal of Periodontology Digital Art Guidelines for more information on submitting your figures.

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

TITLE PAGE

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

ABSTRACT OR INTRODUCTION

Please see specific instructions provided for each manuscript category.

KEY WORDS

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

TEXT

Please see specific instructions provided for each manuscript category.

ACKNOWLEDGMENT(S) AND CONFLICTS OF INTEREST

Acknowledgment(s)

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

Conflicts of Interest

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

Authors are required to submit:

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

2) A conflict of interest and financial disclosure form for each author. This form can be found on Scholar One Manuscripts (<http://mc.manuscriptcentral.com/jperio>) in the upper right-hand corner under "Instructions & Forms." The form should be completed by each author and provided to the corresponding author. The corresponding author is responsible for submitting these forms from each author when the manuscript is submitted. These forms should be sent to Jerry Eberle, Editorial Coordinator, either via e-mail at jerry@perio.org or fax at 312/573-3225. These forms can also be uploaded in the cover letter area during the manuscript submission process.

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

Example of Conflict of Interest Statement:

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

REFERENCES

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

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

The use of abstracts as references is strongly discouraged. Manuscripts accepted for publication may be cited and should include the manuscript's DOI, if known. Material submitted, but not yet accepted, should be cited in text as "unpublished observations." Written and oral personal communications may be referred to in text, but not cited as references. Please provide the date of the communication and indicate whether it was in a written or oral form. In addition, please identify the individual and his/her affiliation. Authors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication. Presented papers, unless they are subsequently published in a proceedings or peer-reviewed journal, may not be cited as references. In addition, Wikipedia.org may not be cited as a reference. For most manuscripts, authors should limit references to materials published in peer-reviewed professional journals. In addition, authors should verify all references against the original documents. References should be typed double-spaced. Examples of references are given below. Authors are encouraged to consult EndNote for the Journal of Periodontology's preferred reference style.

Journals

1. Standard journal reference. Note: list all authors if six or fewer; when seven or more, list only first three and add et al. Kurita-Ochiai T, Seto S, Suzuki N, et al. Butyric acid induces apoptosis in inflamed fibroblasts. *JDentRes* 2008;87:51-55.
2. Corporate author. Federation Dentaire Internationale. Technical report no. 28. Guidelines for antibiotic prophylaxis of infective endocarditis for dental patients with cardiovascular disease. *Int Dent J* 1987;37:235.
3. Journal paginated by issue. Card SJ, Caffesse RG, Smith BA, Nasjleti CE. New attachment following the use of a resorbable membrane in the treatment of periodontitis in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1989;9(1):59-69.

4. Non-English-language titles translated into English. Buchmann R, Khoury F, Hesse T, Müller RF, Lange DE. Antimicrobial therapy of peri-implant disease (in German). *ZZahna ärztl Implantol* 1996; 12:152-157.

Books and Other Monographs

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

Electronic Citations

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

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

TABLES

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

FIGURE LEGENDS

Legends should be typed double-spaced with Arabic numbers corresponding to the figure. When arrows, symbols, numbers, or letters are used, explain each clearly in the legend; also explain internal scale, original magnification, and method of staining as appropriate. Panel labels should be in capital letters. Legends should not appear on the same page as the actual figures.

FIGURES

Please see the Journal of Periodontology Digital Art Guidelines for detailed instructions on submitting high quality images to the Journal of Periodontology.

EQUATIONS

Create an equation as text, treating any mathematical symbols as special characters and assigning them the Symbol font.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

The Journal of Periodontology includes supplemental material in the online Journal (www.joonline.org). All supplemental material should be called out in the text. Supplemental Figures and Tables Journal of Periodontology articles are limited to a combined total of six figures and tables in the print publication. Any additional figures and tables should be submitted as supplemental files. Each supplemental figure or table should be submitted as a separate file. Please follow the guidelines regarding resolution, format, etc. for printed figures (see Digital Art Guidelines) and tables (see above) when preparing supplemental figures and tables. In summary, each figure, table, or multimedia file should be uploaded separately and the file names should clearly identify the file (i.e., SupplementalFigure1.tif, SupplementalTable1.xls, etc.). If file size limitations prevent you from uploading your supplemental material, please e-mail bethanne@perio.org.

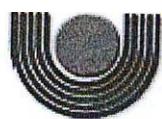
Supplemental Videos

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

STATISTICS

Statistical methods should be described such that a knowledgeable reader with access to the original data could verify the results. Wherever possible, results should be quantified and appropriate indicators of measurement error or uncertainty given. Sole reliance on statistical hypothesis testing or normalization of data should be avoided. Data in as close to the original form as reasonable should be presented. Details about eligibility criteria for subjects, randomization, methods for blinding of observations, treatment complications, and numbers of observations should be included. Losses to observations, such as dropouts from a clinical trial, should be indicated. General-use computer programs should be listed. Statistical terms, abbreviations, and symbols should be defined. Detailed statistical, analytical procedures can be included as an appendix to the paper if appropriate.

ANEXO C: APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

Parecer de Protocolo

O protocolo intitulado "Avaliação do efeito da obesidade induzida pelo glutamato monossódico (MSG) sobre os tecidos periodontais de ratos com doença periodontal induzida por ligadura", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 09/04/2013

Profa. Dra. Luçiana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2861/2012-GRE