

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

**JOSSINELMA CAMARGO GOMES**

**EFEITOS DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL SOBRE A MORFOFISIOLOGIA  
COGNITIVA DO HIPOCAMPO**

CASCAVEL-PR  
(Fevereiro/2020)

**JOSSINELMA CAMARGO GOMES**

**EFEITOS DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL SOBRE A MORFOFISIOLOGIA  
COGNITIVA DO HIPOCAMPO**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa De Pós-Graduação em Biociências e Saúde – 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

CASCAVEL-PR  
(Fevereiro/2020)

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Camargo Gomes, Jossinelma  
Efeitos da periodontite experimental sobre a  
morfofisiologia cognitiva do hipocampo / Jossinelma  
Camargo Gomes; orientador(a), Carlos Augusto Nassar, 2020.  
118 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste  
do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências  
Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em  
Biociências e Saúde, 2020.

1. Periodontite. 2. Hipocampo. I. Augusto Nassar,  
Carlos. II. Título.



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Cascavel CNPJ 78680337/0002-65  
Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário - Cx. P. 000711 - CEP 85819-110  
Fone:(45) 3220-3000 - Fax:(45) 3324-4566 - Cascavel - Paraná

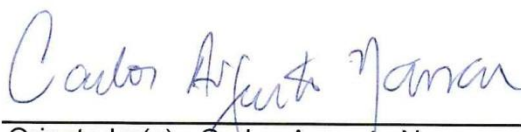


**PARANÁ**  
GOVERNO DO ESTADO

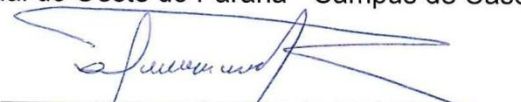
## JOSSINELMA CAMARGO GOMES

Efeitos da periodontite experimental sobre a morfofisiologia cognitiva do hipocampo .

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biociências e Saúde, área de concentração Biologia, Processo Saúde-doença e Políticas de Saúde, linha de pesquisa Processo Saúde-doença, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

  
Orientador(a) - Carlos Augusto Nassar

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

  
Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

  
Ivo Ilyan Kerppers

Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)

Cascavel, 28 de fevereiro de 2020

## **DEDICATÓRIA**

“Dedico este trabalho primeiramente a Deus e à minha família, em especial à minha mãe Maria da Conceição Camargo Gomes e à minha irmã Jossiane Camargo Gomes”.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, agradeço também por minha vida, família, e amigos, e pelas oportunidades, saúde e motivação.

À Instituição e ao programa Biociências e Saúde pela oportunidade e espaço, ao seu corpo docente, direção e administração.

Ao professor Dr. Carlos Augusto Nassar, pela orientação, apoio, confiança, paciência, oportunidade e empenho dedicado à elaboração deste trabalho, bem como correções e incentivos.

Ao professor Dr. Ivo Ilvan Kerppers, por ter me dado a primeira oportunidade de pesquisa, através da Iniciação Científica, por todos os conselhos e incentivos (por não ter deixado que eu abandonasse o curso de Fisioterapia e também pelo incentivo a assumir o mestrado).

À professora Dra. Sara Cristina Sagae Schneider por todo o seu tempo dedicado as minhas dúvidas e a este trabalho, por sua paciência, boa vontade, incentivos e acessibilidade.

Às Professoras: Dra. Rose Meire Costa Brancalhão, e Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro, e Celeste da Rocha Paiva pelos auxílios no laboratório.

Às amigas colegas da pós-graduação, Bianca Caroline Custódio dos Santos, Iohana Ferreira Choptian Fiorese, Ana Paula Farina Rosolen, Maria Luiza Serradourada Wutzke e Ana Caroline Barbosa Retameiro, pela integral disponibilidade. Em especial à Bianca Caroline Custódio dos Santos, a qual foi imprescindível para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço à minha mãe Maria da Conceição Camargo Gomes pelo incentivo e apoio incondicional. À minha irmã Jossiane Camargo Gomes por ser a minha maior incentivadora, sempre me encorajou a perseverar, e em especial pelo incentivo em fazer a prova e assumir a vaga, e, também ao meu irmão Jociel Camargo Gomes (*in memoriam*), que infelizmente nos deixou muito cedo e não pode acompanhar minha graduação, porém em mim deixou uma marca, a de sempre perseverar nos estudos!

Meus agradecimentos àqueles que fizeram parte de minha formação e que vão continuar presentes em minha vida.

## RESUMO

GOMES, J. C. **Efeitos da periodontite experimental sobre a morfofisiologia cognitiva do hipocampo**. 118 páginas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2020.

Evidências recentes mostram uma possível relação causal entre periodontite e doenças neurodegenerativas. Alterações no hipocampo podem resultar em redução de funções cognitivas como comportamentos associados à memória e às emoções. O objetivo deste estudo foi avaliar alterações sobre o hipocampo e comportamentos associados de ratos com periodontite experimental induzida por ligadura. Foram utilizados 20 ratos *Wistar* machos com 12 semanas de idade, divididos em dois grupos: Grupo Controle (GC) e Grupo Doença Periodontal (GDP). O GDP recebeu uma ligadura ao redor dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo por 30 dias, causando uma periodontite induzida experimentalmente. Os animais de ambos os grupos foram submetidos a três testes comportamentais: Campo Aberto / *Open Field* Labirinto em Cruz Elevado e Teste de Reconhecimento de Objetos; para avaliação de atividade exploratória, locomotora, ansiedade e de memória, em dois tempos, sendo estes: antes no 27, 28 e 29 dias após a indução da periodontite. Após 30 dias foi realizada a eutanásia, e, a coleta dos hipocampus (análise histológica e imunológica) e, também, das hemimandíbulas (análise histológica, histomorfométrica e radiográfica). Os resultados foram analisados pelo programa *GraphPad*, sendo realizado o teste de *Shapiro-Wilk* e o teste T de *Student* ( $p < 0.05$ ). Os testes comportamentais foram analisados pelo teste *Two-Way* ANOVA. O GDP apresentou maior ansiedade (Teste de Labirinto em Cruz Elevado), menor habituação (Teste *Open Field*) e redução do tempo de exploração do objeto novo (Teste de Reconhecimento de Objetos) em relação ao GC ( $p < 0.05$ ). Ainda o GDP apresentou menor número de osteócitos e osteoblastos e maior atividade osteoclástica ( $p < 0.05$ ), bem como maior perda óssea alveolar morfometricamente e radiograficamente ( $p < 0.05$ ) em relação ao GC. No hipocampo, notou-se presença de placas senis, além de marcações positivas de beta-amiloide, tau e CD68 no GDP. Logo se pode concluir que a DP desencadeou a presença de placas senis, marcações positivas de beta-amiloide, tau e CD68, os quais, em conjunto, manifestaram um processo de neuroinflamação inicial nesses animais.

**Palavras-Chave:** Periodontite. Ratos. Hipocampo. Inflamação.

## ABSTRACT

GOMES, J. C. **Effects of experimental periodontitis the cognitive morphophysiology of the on the hippocampus.** 118 páginas. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2020.

Late evidence demonstrates a possible causal relationship between periodontitis and neurodegenerative diseases. Changes in the hippocampus can result in reduced cognitive functions, such as behaviors associated with memory and emotions. This study aimed to evaluate changes in the hippocampus and associated behaviors of rats with ligature-induced experimental periodontitis. Twenty 12-week-old male Wistar rats were used, divided into two groups: Control Group (CG) and Periodontal Disease Group (PDG). PDG received a bandage around the left and right first molars for 30 days, causing experimentally induced periodontitis. The animals of both groups were submitted to three behavioral tests (Open Field, Elevated Plus Maze, and Object Recognition) to assess locomotor and exploratory activities, anxiety, and memory, in two stages, being these: before and on the 27<sup>th</sup> day of the experiment, and 28 and 29 days after periodontitis induction. After 30 days, the rats underwent euthanasia and collection of the hippocampus (histological and immunological analysis) and hemimandibles (histological and radiographic analysis). The results were analyzed through the GraphPad software, using the Shapiro-Wilk test and the Student's t-test ( $p < 0.05$ ). Behavioral tests were analyzed using the Two-Way ANOVA test. PDG showed more considerable anxiety (Elevated Plus Maze Test), less habituation (Open Field Test), and reduced time to explore the new object (Object Recognition Test) compared to CG ( $p < 0.05$ ). Besides, PDG had a lower number of osteocytes and osteoblasts, and higher osteoclastic activity ( $p < 0.05$ ), as well as more significant alveolar bone loss morphometrically and radiographically ( $p < 0.05$ ) compared to CG. In the hippocampus, senile plaques were noted, in addition to positive beta-amyloid, tau, and CD68 markings on PDG. Therefore, it can be concluded that PD triggered the presence of senile plaques, beta-amyloid, tau, and CD68 positive markings, which, together, manifested an initial neuroinflammation process in these animals.

**Keywords:** Periodontitis. Mouse. Hippocampus. Inflammation.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Fotografias dos instrumentos para a indução da doença periodontal por meio de ligadura.....	29
<b>Figura 2</b> - Fotografias da técnica de indução da doença periodontal.....	29
<b>Figura 3</b> - Fotografia do Labirinto em Cruz Elevado.....	31
<b>Figura 4</b> - Fotografia do <i>Open Field</i> .....	33
<b>Figura 5</b> - Fotografia do equipamento utilizado para o Teste de Reconhecimento de Objetos.....	35
<b>Figura 6</b> - Fotografias dos objetos do Teste de Reconhecimento de Objetos.....	37
<b>Figura 7</b> - Radiografia representativa da medida da distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar da hemimandíbula esquerda.....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS

DP	Doença Periodontal
DA	Doença de Alzheimer
A $\beta$	Beta-amiloide
APP	Proteína precursora amiloide
LABEF	Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional
°C	Celsius
CA	<i>Corno de Ammon</i>
CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
COA	Crista óssea alveolar
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DA	Doença de Alzheimer
DAB	3,30-diaminobenzidina
DP	Periodontite
GC	Grupo Controle
GD	Giro denteado
GDP	Grupo Doença Periodontal
HE	Hematoxiliana e Eosina
IL	Interleucina
JEC	Junção cimento-esmalte
LAFEM	Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LPS	Lipopolissacarídeo
NP	Neurônio piramidal
PBS	Tampão fosfato-salino
RD	Razão de Discriminação
S	Segundos

SNC	Sistema Nervoso Central
TCA	Ácido tricloroacético
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
TPA	Tempo de permanência no braço aberto
TPC	Tempo de permanência no centro
TPF	Tempo de permanência no braço fechado
TPP	Tempo de permanência na periferia
$\mu\text{m}$	Micrômetro
UNICENTRO	Universidade Estadual do Centro-Oeste
UNIOESTE	Universidade Estadual do Oeste do Paraná
x	Vezes

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>17</b>
2.1	Objetivo geral.....	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
3.1	DOENÇA PERIODONTAL.....	18
3.2	DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS.....	19
3.3	RELAÇÃO ENTRE PERIODONTITE E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS.....	20
3.4	HIPOCAMPO.....	21
3.5	MEMÓRIA E HIPOCAMPO.....	22
3.6	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	23
3.6.1	Labirinto em Cruz Elevado.....	23
3.6.2	Campo Aberto / <i>Open Field</i> .....	24
3.6.3	Teste de Reconhecimento de Objetos.....	25
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>27</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	27
4.2	AMOSTRA.....	27
4.3	CÁLCULO AMOSTRAL.....	28
4.4	PROTOCOLO DE INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL.....	28
4.5	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	30
4.6	ANÁLISE HISTOLÓGICA DA MANDÍBULA.....	30
4.7	ANÁLISE RADIOGRÁDICA DA MANDÍBULA.....	30
4.8	HISTOMORFOMETRIA DO OSSO.....	31
4.9	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	32
4.9.1	Campo Aberto / <i>Open Field</i> .....	32
4.9.2	Labirinto em Cruz Elevado.....	33

4.9.3	Teste de Reconhecimento de Objetos.....	35
4.10	ANÁLISE HISTOLÓGICA DO HIPOCAMPO.....	37
4.11	IMUNO-HISTOQUÍMICA DO HIPOCAMPO.....	38
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
<b>5</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>40</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES FINAIS.....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS GERAIS.....</b>	<b>81</b>
	<b>ANEXO A.....</b>	<b>100</b>
	<b>ANEXO B.....</b>	<b>118</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) ou periodontite é um processo inflamatório em resposta à antígenos bacterianos provenientes de placa dentária (ALVES et al., 2007). Essa condição crônica, multifatorial e progressiva caracteriza-se pela destruição dos tecidos de sustentação do dente. A desagregação desses tecidos, cuja progressão pode levar à mobilidade, também pode provocar a perda dos dentes (TONETTI et al., 2013).

A placa bacteriana é responsável pelo surgimento e pela manutenção da DP, no entanto, mecanismos de defesa do hospedeiro desempenham um importante papel na sua patogênese (GENCO; OFFENBACHER; BECK, 2002), tal como a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (GARLET, 2010). Acredita-se que a doença inflamatória seja um desequilíbrio proveniente da maior concentração de citocinas pró-inflamatórias em detrimento das anti-inflamatórias, levando à destruição dos tecidos (PAGE, 1998). Portanto, a DP é um problema de saúde oral tal como uma questão de saúde pública, uma vez que está relacionada à saúde sistêmica (SURESH; MAHENDRA, 2014).

O papel da DP como fator de risco para múltiplas doenças sistêmicas é algo amplamente aceito. Dentre essas doenças, destaca-se àquelas pertencentes ao grupo de demência, principalmente a Doença de Alzheimer (DA). Acredita-se haver uma associação entre DP e DA e, ainda supõe-se que patógenos periodontais contribuem para uma inflamação neural e por consequência, age como um preditor de Alzheimer ou, ainda piora uma condição demencial pré-existente (CERAJEWSKA; DAVIES; WEST, 2015; CESTARI et al., 2016). Em suma, há evidências de que infecções periféricas podem agravar processos inflamatórios no cérebro (AGNIHOTRI, 2015).

A demência é uma síndrome caracterizada pelo declínio cognitivo progressivo que interfere nas atividades sociais e ocupacionais do indivíduo (COREY-BLOOM et al., 1995). Essa é uma manifestação comum a diversas doenças, sendo a doença a

principal causa de demência, correspondendo a cerca de 60% dos casos em países em desenvolvimento (KALARIA et al., 2008). Em modelos animais foi observado a presença de acúmulo de peptídeo beta-amiloide(A $\beta$ ) no cérebro de ratos com DP, sendo esse peptídeo responsável pela perda neuronal e em muitos casos, pode evoluir para um processo demencial (SINHA, 2002).

O hipocampo é uma estrutura chave envolvida na aquisição de memórias, que através de uma série de processos bioquímicos, estabelece conexões com outras áreas, como a Amígdala e o Córtex Entorrinal e assim, controla a consolidação de memórias (MACHADO, 2006). Ademais, o hipocampo é uma das regiões mais vulneráveis à neurodegeneração, sendo uma das estruturas mais prejudicadas na DA e apresentando, dentre as inúmeras alterações, perda sináptica e morte neuronal, característicos do Alzheimer (SELKOE, 2001).

A memória declarativa depende da integridade do hipocampo e de outras estruturas do lobo temporal (MILNER; SQUIRE; KANDEL, 1998), mas particularmente, o hipocampo é necessário para a formação das memórias episódicas, (IZQUIERDO et al., 1998) essas memórias são as mais afetadas de forma negativa doenças neurodegenerativas (DANION et al., 2001), além dessas serem vulneráveis ao processo de envelhecimento (SHARMA et al., 2010).

As alterações sistêmicas que a periodontite pode causar tornam o paciente um possível foco de uma terapêutica interdisciplinar, e, no caso das doenças neurodegenerativas o paciente também necessitará de uma abordagem interdisciplinar. Assim, tanto a periodontite como a presença de doença neurodegenerativa, são condições que quando apresentadas por um paciente, isolada ou associadas, necessitam da atenção de uma equipe de saúde, uma vez que o indivíduo pode apresentar alterações sistêmicas, além de complicações. Portanto, uma condição inicial, como a periodontite, se não estabilizada pode tornar-se um significativo problema de saúde para o indivíduo.

Sabe-se que uma parte considerável da população mundial é afetada por doenças periodontais (DYE, 2012; EKE et al., 2015; OPPERMANN et al., 2015), bem como doenças neurodegenerativas, caracterizadas por demência (PLUM, 1979), sendo que ambas as condições, na atualidade, representam um relevante e crescente problema de saúde pública.

A hipótese deste estudo é que a DP induzida resultará em alterações inflamatórias sistêmicas, podendo afetar, de forma negativa, o hipocampo e comportamentos associados.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar alterações sobre o hipocampo e comportamentos associados de ratos com periodontite experimental induzida por ligadura.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Em animais com periodontite induzida ou não:

- Avaliar a atividade exploratória, locomotora, ansiedade e memória dos animais;
- Realizar uma análise descritiva morfológica do tecido periodontal da mandíbula;
- Avaliar histometricamente a altura da crista alveolar da mandíbula;
- Analisar radiograficamente a perda óssea alveolar;
- Analisar histologicamente e imunohistoquicamente o hipocampo.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 DOENÇA PERIODONTAL

As doenças periodontais caracterizam-se como inflamatórias, crônicas, progressivas e multifatoriais, envolvendo microorganismos, fatores genéticos, fatores ambientais e a resposta do hospedeiro (DI BENEDETTO et al., 2013; OFFENBACHER et al., 1996).

Normalmente, os indivíduos com periodontite são assintomáticos e apesar da alta prevalência na população adulta de países desenvolvidos e em desenvolvimento, esta ainda é uma doença pouco reconhecida por pacientes e profissionais de saúde (EKE et al., 2015; OPPERMANN et al., 2015). Além disso, os indivíduos mais afetados são aqueles de baixa escolaridade e pertencentes as classes sociais menos favorecidas (TOREGANI et al., 2014; VETTORE; MARQUES; PERES, 2013).

A incidência da DP é estimada em aproximadamente 50% de adultos humanos, com 10% apresentando periodontite grave (EKE et al., 2015) e esta incidência aumenta drasticamente em adultos com mais de 65 anos de idade (EKE et al., 2015; RENVERT; PERSSON; PERSSON, 2013).

As doenças periodontais podem ser classificadas em gengivite, quando a inflamação está na gengiva propriamente dita, ou em periodontite, quando apresentam caráter mais severo e destrutivo caracterizado por uma resposta imunológica exuberante do hospedeiro aos patógenos periodontais, com o processo inflamatório oral, decorrente da periodontite, associada à infecção bacteriana, expondo as estruturas de sustentação dos dentes, atingindo o tecido conjuntivo e ósseo, resultando em perda de massa óssea e de inserção (PALLOS; CESCHIN; VICTOR, 2006; KAMER et al., 2008; TOREGANI et al., 2014).

Em consequência da inflamação atingir as estruturas de fixação dos dentes (osso alveolar, cemento e ligamento periodontal), a reabsorção do osso alveolar,

que é a responsável pela perda dental, expressa a perturbação da homeostase entre a resposta imune do hospedeiro e do agente causador (GARLET et al., 2012; HAJISHENGALLIS, 2015; MOOTHA et al., 2016).

As bactérias orais, decorrentes do processo de DP, liberam diversas citocinas pró-inflamatórias locais, as quais também são responsáveis pela inflamação sistêmica (GARLET et al., 2012; LINS et al., 2007; SCHENKEIN; LOOS, 2013). Assim, a DP pode elevar o estado pró-inflamatório sérico com o aumento dos níveis circulantes de mediadores pró-inflamatórios sistêmicos como a proteína C reativa, IL-1 (interleucina), IL-6, IL-12, IL-18 e IL-21 e reduzir níveis de marcadores anti-inflamatórios como a IL-4 e IL-10 (LEISHMAN; SEYMOUR; FORD, 2013; MOOTHA et al., 2016; SCHENKEIN; LOOS, 2013; IDE et al., 2016).

A destruição dos tecidos de suporte dos dentes, a promoção no crescimento de bactérias e a formação da placa bacteriana são os eventos responsáveis pela inflamação local e, por conseguinte, pela inflamação sistêmica (CORTÉS-VIEYRA; ROSALES; QUEROL, 2016; MARQUES et al., 2015). Desse modo, atualmente está bem estabelecido na literatura que a DP pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de distúrbios sistêmicos (NAGPAL; YAMASHIRO; IZUMI, 2015).

Ademais, acredita-se que a inflamação periférica pode ativar as células da microglia e promover a geração de citocinas pró-inflamatórias no Sistema Nervoso Central (SNC), tais como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral-alfa), resultando assim em uma neuroinflamação (HO et al., 2015). Portanto, pode haver uma ligação entre DP e diversas doenças inflamatórias, bem como doenças neurodegenerativas (LIU et al., 2013).

### 3.2 DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

A demência é uma condição cerebral degenerativa responsável pelo declínio progressivo da função cognitiva e emocional (CYPRIANI et al., 2015; SCOTT; BARRET, 2007). Essa condição prejudica a qualidade de vida, causando grave impacto emocional e econômico nos pacientes e seus cuidadores (CIEZA et al., 2015; COENEN et al., 2016). Atualmente não há cura conhecida para demência (KUMAR; SINGH; EKAVALI, 2015) e dentre os portadores, 90% encontram-se institucionalizados em casas de repouso (GIVENS et al., 2012).

A etiologia é desconhecida e acredita-se que seja multifatorial, podendo ocorrer por causas genéticas, ambientais ou endógenas. Além disso, é relatado que infecções ou processos inflamatórios podem aumentar o risco de desenvolver algum tipo de demência (JELLINGER, 2009; KAO et al., 2015).

O comprometimento cognitivo, normalmente aparece antes da demência propriamente dita, fase em que tanto o comprometimento cognitivo como a disfunção comportamental não são suficientemente graves para apresentarem repercussões funcionais (PETERSEN, 2016).

Após a sua instalação, a demência vai gerar vários sintomas no indivíduo, como: perda de memória, confusão, dificuldade nas atividades de vida diária e atividades domiciliares, além de mudanças comportamentais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Com a progressão da doença, haverá ainda dificuldade em realizar ações neuromusculares, como: deglutição, caminhada e respiração, levando à morte (PLASSMAN et al., 2007).

A patogênese da demência é algo pouco compreendido (NOBLE; SCARMEAS; PAPAPANOU, 2013), dentre as suposições, acredita-se que a neuroinflamação é a responsável pelo dano neuronal. Essa neuroinflamação causaria uma cascata de eventos no Sistema Nervoso Central (SNC), começando pela estimulação de células gliais para produzir citocinas pró-inflamatórias como proteína C reativa, TNF-  $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (MCGEER; MCGEER, 2001; VEZZANI et al., 2011). Em consequência, as células gliais seriam estimuladas a produzir moléculas de proteínas patológicas, tais como proteínas tau e peptídeos beta-amiloide<sub>1-42</sub> (A $\beta$ ), sendo que estas seriam responsáveis pelos danos celulares e culminariam em neurodegeneração (GOSSELIN; RIVEST, 2007; DANTZER et al., 2000; KONSMAN; DRUKARCH; VANDAM, 2007; NEE; LIPPA, 1999). Assim, sugere-se que a demência é causada por danos neuronais em resposta à inflamação crônica de fontes periféricas em decorrência da DP (TONSEKAR; JIANG; YUE, 2017).

### 3.3 RELAÇÃO ENTRE DOENÇA PERIODONTAL E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

Existe um interesse científico crescente na hipótese de associação entre doenças bucais e sistêmicas, pois os agentes patogênicos orais podem atingir a corrente sanguínea, além de que as citocinas e os radicais livres podem deprimir o

sistema imunológico do indivíduo (BRESOLIN et al., 2014; NAGPAL; YAMASHIRO; IZUMI, 2015). Desse modo, acredita-se que a infecção periodontal e a resposta imunoinflamatória contra patógenos periodontais podem aumentar a suscetibilidade do hospedeiro em desenvolver doenças sistêmicas (PAZOS et al., 2018; GANESH et al., 2017) e caso, bactérias entrem em contato com o SNC e/ou haja estimulação de produção de citocinas nesse mesmo local, esses eventos podem gerar uma resposta neuroinflamatória (ABBAYYA et al., 2015; KAMER et al., 2008).

Acredita-se que caso ocorra uma infecção bacteriana no SNC, o indivíduo que apresente uma suscetibilidade genética para doenças neuroinflamatórias, pode apresentar uma resposta imune inata exagerada, tornando-o propenso a desenvolver neurodegeneração (SINGHRAO et al., 2015).

Apesar de as evidências da relação entre a DP e o declínio cognitivo ainda serem escassos, respostas têm sido buscadas apoiando-se na hipótese do papel da inflamação sistêmica (IDE et al., 2016).

### 3.4 HIPOCAMPO

O hipocampo pertence à região medial de cada hemisfério encefálico, sendo uma estrutura subcortical do lobo temporal (IZQUIERDO et al., 1998; KIVISAARI; PROBST; TAYLOR, 2013), exerce funções relacionadas ao comportamento e aos processos cognitivos de aquisição de aprendizagem espacial e consolidação de memória de curto e de longo prazo (MACHADO, 2006; RIEDEL; MICHEAU, 2002), vale ressaltar que essa estrutura está envolvida na memória do tipo declarativa, contextual e episódica em seres humanos (BURGER, 2010; DUZEL; VAN PRAAG; SENDTNER, 2016) e modula a memória espacial em roedores, visto a tendência natural desses em explorar novidades (VOGEL-CIERNIA; WOOD, 2014). Além disso, também está relacionado com a tomada de decisões (GUYTON; HALL, 2006) e com o sistema límbico (KIVISAARI; PROBST; TAYLOR, 2013).

Anatomicamente, a formação hipocampal é constituída pelas seguintes estruturas: córtex entorrinal, giro denteado (GD), hipocampo propriamente dito ou *Corno de Ammon* (CA) e subículo. O hipocampo de ratos é subdividido em campos: CA1, CA2 e CA3 (IZQUIERDO et al., 1998). Em relação às camadas celulares, o principal constituinte da camada do GD é a célula granular e das áreas CA é a célula piramidal (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008).

O hipocampo de roedores caracteriza-se como alongado no eixo dorso-ventral, sendo que, funcionalmente acredita-se que a porção ventral está associada ao processamento emocional e a região dorsal está relacionada à memória e ao aprendizado (BANNERMAN et al., 2004; STRANGE, 2014).

Lesões no hipocampo de animais refletem negativamente no desempenho de tarefas que necessitam de aprendizado (DEACON; RAWLINS, 2002; NILSSON, et al., 1987). Além disso, o hipocampo participa junto à amígdala nos comportamentos defensivos, de fuga e esquivas, associados ao medo e à ansiedade, respectivamente (BANNERMAN et al., 2004).

O estresse pode causar disfunções no hipocampo (SAPOLSKI et al., 1990), além de outros fatores como inflamação e envelhecimento. Tais eventos podem ser neurotóxicos a essa estrutura (BROWN; RUSH; MCEWEN, 1999; MCEWEN, 2000), gerando prejuízos à aprendizagem e à memória (HUOT et al., 2002).

### 3.5 MEMÓRIA E HIPOCAMPO

Memória é a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações (IZQUIERDO, 2002).

As memórias podem ser classificadas conforme sua duração, em: memória de trabalho, de curta duração e de longa duração; e quanto ao conteúdo, em: implícita e explícita (IZQUIERDO et al., 2002). A memória implícita ou não-declarativa é aquela que não depende da consciência para sua evocação; já a memória explícita ou declarativa, necessita de consciência (BEST; WHITE; MINAI, 2001). As memórias explícitas são classificadas em: episódicas, relacionada a eventos e a experiência pessoal; ou semântica, relacionadas à memória de fatos (SQUIRE; WIXTED, 2011; ULLMAN, 2004).

O hipocampo atua no aprendizado e no armazenamento da representação do ambiente espacial, codificando-o em mapas cognitivos. Esses mapas são construídos conforme as interações entre indivíduo e objeto frente aos estímulos do ambiente. Mapa cognitivo é a construção de pistas associadas a uma localização, capacitando o animal à orientação conforme o uso dessas pistas. Conforme esta teoria, os animais são capazes de criar relações espaciais entre os objetos no ambiente dentro de um contexto (O'KEEFE; NADEL, 1978). Assim, o hipocampo é

ativado quando o animal se desloca durante uma exploração livre (O'KEEFE; DOSTROVSKY, 1971), estando envolvido no processamento de tarefas espaciais (KIM; FANSELOW, 1992; MORRIS et al., 1981).

Sabe-se que o hipocampo é o principal responsável pela consolidação, recuperação e extinção de diversos testes de memória executados em animais e humanos (IZQUIERDO et al., 2004), visto que testes comportamentais em roedores fornecem conhecimento sobre tarefas que dependem da integridade do hipocampo, permitindo assim, uma maior exploração da sua estrutura e função (DRISCOLL; SUTHERLAND, 2005). Por isso, testes de memória, como o de reconhecimento de objetos, e testes de memória espacial, como o labirinto de Barnes, são amplamente utilizados em animais (MELLO et al., 2008).

### 3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

#### 3.6.1 Labirinto em Cruz Elevado

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) surgiu dos experimentos de Montgomery (1955), inicialmente com um labirinto em Y elevado, o qual foi utilizado para investigar o conflito entre as reações de medo e exploração de roedores frente a um estímulo novo (ambiente novo). Montgomery observou que a reação de exploração levava à aproximação ao novo ambiente, enquanto o medo levava o roedor a evitar esse ambiente, gerando assim, um conflito de aproximação-avoidância. Esse conflito ocorre entre a preferência pelas áreas protegidas (braços fechados) e pela motivação em explorar novos ambientes (braços abertos) (MONTGOMERY, 1955; MONTGOMERY; MONKMAN, 1955; RODGERS; COLE, 1994). Portanto, a relação entre medo e novidade resulta em um conflito entre aproximação e proteção em relação aos braços abertos (CAROBREZ; BERTOGLIO, 2005).

Com base nos experimentos de Montgomery (1955), Handley e Mithani (1984) desenvolveram um LCE, semelhante ao da atualidade. Esse labirinto foi validado comportamental, fisiológica e farmacologicamente para ratos, por Pellow et al. (1985) e é um instrumento válido para medir ansiedade e exploração espontânea (PELLOW et al., 1985; RODGERS; COLE, 1994).

A avaliação comportamental é realizada principalmente conforme as medidas espaço-temporais de deslocamento (entradas e tempo gasto nos braços). No

entanto, existem outros parâmetros, como: frequência de imobilidade / congelamento / *freezing*; frequência de autolimpeza / *grooming*; frequência de elevações / *rearing*; número de quadrantes percorridos (ambulação); número de bolos fecais e presença / ausência de micção (XAVIER, 1999).

As entradas e o tempo gasto nos braços do LCE estão associados a índices de ansiedade. Portanto, quanto mais intensa a ansiedade, menor a porcentagem de entradas e de tempo gasto nos braços abertos (PELLOW; FILE, 1986; HANDLEY; MITHANI, 1984; HOGG, 1996).

O comportamento *rearing* avalia a atividade vertical e está relacionado ao aumento da atividade locomotora (CRUZ; FREI; GRAEFF, 1994), sendo esse comportamento mais prevalente nos braços fechados devido à tigmotaxia (MARTINEZ et al., 2002) - tendência de ratos se esquivarem de áreas abertas, desconhecidas e potencialmente perigosas, associada a preferência do animal em se manter próximo a superfícies verticais (CHOLERIS et al., 2001; GARCIA; CARDENAS; MORATO, 2011).

O *grooming* está associado negativamente com os comportamentos de deslocamento e de atividade vertical (RODGERS; JOHNSON, 1995). Além disso, o comportamento de limpeza e a defecação estão relacionados ao estado emocional do animal (CARLINI et al., 1986), sendo o número de bolos fecais considerado uma forma de ansiedade ou medo (HILL; GORZALKA, 2006). Além disso, a resposta *freezing* também está relacionada ao medo (BOLLES; FANSELOW, 1980; BOLLES; RILEY, 1973), caracterizada como uma reação de defesa (FANSELOW; LESTER, 1988).

Os comportamentos anteriormente citados estão relacionados à ansiedade e normalmente são identificados em roedores expostos a ambientes novos, abertos e iluminados (EILAM, 2003; WALKER; DAVIS, 1997).

### 3.6.2 Campo Aberto / *Open Field*

Este teste foi desenvolvido por Hall (1934) inicialmente para o estudo da emocionalidade de ratos.

O procedimento basicamente consiste em confrontar o animal com um ambiente novo (PRUT; BELZUNG, 2003) com a possibilidade de avaliar principalmente a atividade locomotora e exploratória do animal, podendo também



ser utilizado como parâmetro de ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003; WHIMBEY; DENENBERG, 1967).

Os movimentos locomotores são os deslocamentos na arena e os comportamentos exploratórios são aqueles realizados sem a necessidade de deslocamento (EILAM, 2003; PRUT; BELZUNG, 2003). Assim, existem diversos parâmetros de avaliação, totalizando, mais de trinta (WALSH; CUMMINS, 1976), dentre esses estão: número de quadrantes percorridos (atividade locomotora e exploratória); tempo gasto nos quadrantes centrais (medida de ansiedade); elevações / *rearings* (comportamento exploratório), *grooming* (medida emocional) e número de bolos fecais (medida emocional) (CARLINI et al., 1986).

Em relação ao número de quadrantes percorridos e ao tempo gasto nos mesmos, geralmente, há uma preferência pela periferia ao invés do centro, com o animal explorando o ambiente em contato com as paredes, ou seja, apresentando tigmotaxia (RAMOS et al., 1997). Portanto, assim como no LCE, a tigmotaxia estaria relacionada com a ansiedade frente ao *Open Field* (CHOLERIS et al., 2001). Ratos com medo apresentam tigmotaxia, evitando explorar o ambiente (não realizando elevações). Além disso, tendem a realizar *freezing* (BOON; WONG, 2003).

Acredita-se que o *rearing* é realizado para ampliar (na primeira sessão ao ambiente novo) e atualizar (no reteste) as informações sobre aquele ambiente durante a exploração, aumentando a eficiência da formação do mapa cognitivo e da defesa espacial (LEVER; BURTON; O'KEEFE, 2006). O hipocampo é a principal estrutura envolvida com o *rearing* (CRUSIO, 2001), posto que, sabe-se da relação entre a atividade elétrica hipocampal e os movimentos mensurados no *Open Field*, principalmente o *rearing* (VAN LIER et al., 2003), já que a estimulação do hipocampo induz ao aparecimento desse comportamento (MA et al., 1996).

O *Open Field* é um modelo de aprendizagem não associativo, visto que a exposição contínua e repetida a um estímulo novo altera o comportamento animal (VIANNA et al., 2000).

### 3.6.3 Teste de Reconhecimento de Objetos

O Teste de Reconhecimento de Objetos foi criado por Ennaceur e Delacour (1988) para avaliar o comportamento exploratório de ratos frente a objetos em um ambiente familiar (ANTUNES; BIALA, 2012). A tarefa consiste em apresentar ao

animal um objeto novo e após algum tempo, o expor novamente ao mesmo objeto (familiar) e a um objeto novo. Este teste é baseado no fato de que, geralmente, roedores passam mais tempo explorando um objeto novo ao invés de um objeto previamente explorado (objeto familiar), assim indicando que o objeto familiar foi reconhecido (BERLYNE, 1950; ENNACEUR; DELACOUR, 1988). Portanto, a memória de reconhecimento é avaliada comparando-se o tempo gasto no objeto familiar e o tempo no objeto novo, sendo este dado convertido na razão de discriminação de objetos (BEVINS; BESHEER, 2006; GARCÍA-MORENO et al., 2002).

Esta tarefa quantifica o comportamento natural de exploração baseado na motivação inata dos animais em explorar a novidade, o que é um instinto de aprendizagem do ambiente pertinente a roedores (ENNACEUR; DELACOUR, 1988).

Através do Teste de Reconhecimento de Objetos e suas variações, pode-se avaliar diferentes tipos de memória de objetos: a memória de reconhecimento do objeto novo e a memória espacial de objeto (EACOTT; NORMAN, 2004; HANNESSON et al., 2004).

Além disso, embora amplamente utilizado, ainda não há um consenso sobre os processos exatos relacionados a esse teste (AGGLETON; PEARCE, 2001; MUMBY, 2001).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Esta é uma pesquisa de abordagem quantitativa, classificada quanto à finalidade como básica, quanto ao objetivo como descritiva e de caráter experimental (GIL, 2007).

Foi realizada no Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF) e Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo(LAFEM) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), na cidade de Cascavel, Paraná, Brasil.

### 4.2 AMOSTRA

Foram utilizados 20 ratos *Wistar* adultos, com 12 semanas de idade, pesando em média 250-300 gramas, provenientes do biotério central da UNIOESTE. Os animais foram mantidos no biotério setorial do LAFEM, sob condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e luz (ciclo claro-escuro de 12 horas), recebendo água e ração comercial à vontade. Os animais foram distribuídos de forma aleatória em dois grupos contendo dez animais em cada:

- Grupo Controle (GC), não sofreram intervenção, sendo eutanasiados no 30º dia do experimento.
- Grupo Doença Periodontal (GDP), foram submetidos ao procedimento de indução da DP por meio de ligadura, sendo eutanasiados no 30º dia do experimento.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE (ANEXO B), estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

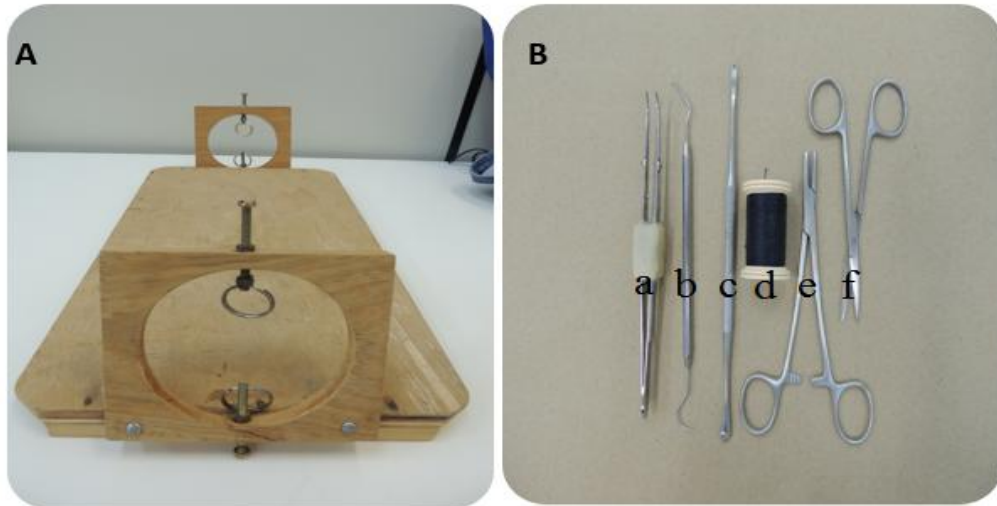
### 4.3 CÁLCULO AMOSTRAL

Todo o cálculo amostral foi baseado no uso do Teste T para cálculo do tamanho das amostras, com poder de 90% e nível de significância de 5%, bem como em prévios estudos do grupo de pesquisadores (PEDROTTI et al., 2016; MATTIA et al., 2017).

### 4.4 PROTOCOLO DE INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL

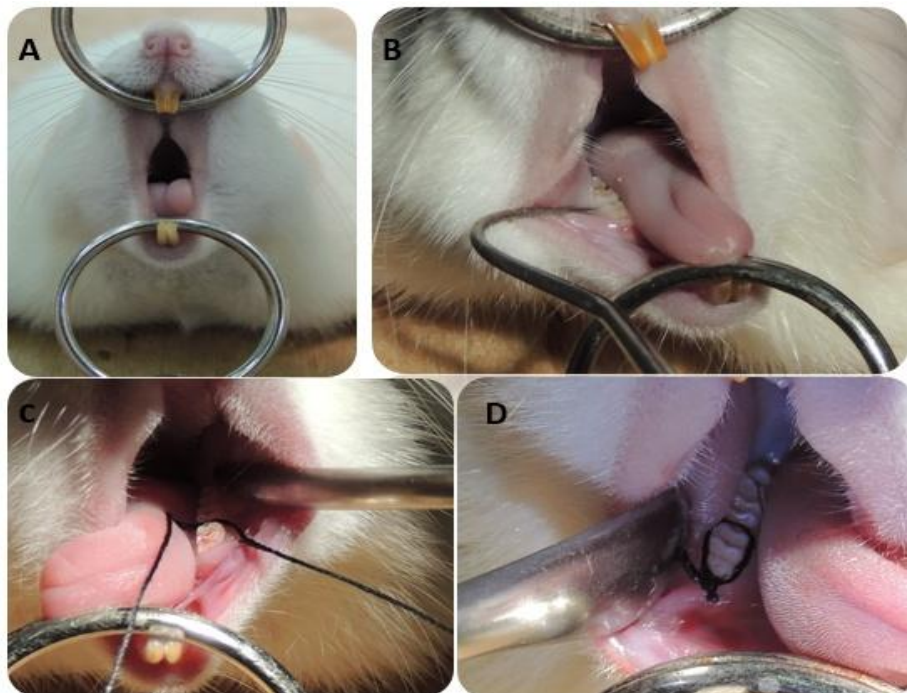
Os animais foram anestesiados com cloridato de quetamina, 0,08mL/100g (Dopalen, Sespo Indústria e Comércio, Paulínia-SP) e xilazina 0,04mL/100g (Anasedan, Sespo Indústria e Comércio, Paulínia-SP) por via intraperitoneal e posicionados em mesa operatória apropriada (figura 1), a qual permitiu a manutenção da abertura bucal facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma pinça modificada e de uma sonda exploradora, foi colocado um fio de algodão número 40 ao redor do primeiro molar inferior direito e esquerdo (figura 2). Esta ligadura atuou como irritante gengival por 30 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e consequente, desenvolvimento da doença periodontal (NASSAR et al., 2009).

**Figura 1** - Fotografias dos instrumentos para a indução da doença periodontal por meio de ligadura. A: Mesa operatória. B: Instrumentos utilizados: pinça modificada (a), sonda exploradora (b), espátula 7 (c), ligadura (d), pinça hemostática reta (e) e tesoura (f).



Fonte:própria.

**Figura 2** - Fotografias da técnica de indução da doença periodontal. A: Abertura da cavidade oral do animal. B: Abertura do espaço entre o 1º e 2º molar inferior com sonda exploradora. C: Colocação da ligadura (fio de algodão número 40) no primeiro molar inferior. D: Ligadura ao redor do primeiro molar inferior, que atuou como irritante gengival.



Fonte: própria.

#### 4.5 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

No último dia de experimento (30<sup>o</sup>), todos os animais foram pesados e, em seguida, eutanasiados através de guilhotina. Foi realizada a coleta do hipocampo direito para realização da análise histológica e imunológica e coleta das hemimandíbulas do lado direito para análise histológica, histomorfométrica e radiográfica para verificar a perda óssea alveolar.

#### 4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA MANDÍBULA

As hemimandíbulas do lado direito foram coletadas, dissecadas e fixadas em solução de formol a 10%, por 48 horas. Após este período, foram lavadas em água corrente por 24 horas e imersas em solução de ácido tricloroacético (TCA) a 5%. As peças foram mantidas na solução descalcificadora por aproximadamente 20 dias e foram avaliadas diariamente a fim de se verificar o grau esperado de descalcificação, sendo trocado a solução TCA a cada 5 dias. Após este intervalo de tempo, as peças foram novamente lavadas em água corrente por 24 horas e foi realizado o processamento histológico automático por aproximadamente 12 horas (Processador automático de tecidos, Leica *Microsystems*® TP1020, Nussloch, Alemanha), onde as peças foram imersas em formol (fixação), álcool (desidratação) e xilol (diafinização ou clareamento). A partir deste, seguiu a inclusão das peças e obtenção de blocos de parafina (Parafina Purificada, cód. 1228, lote 1008459, Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil). Os mesmos foram cortados em micrótomo semi-automático (*Hestion*®, *ERM3000*, *Daintre e Scientific*, *St. Helens*, Austrália) e obtidos cortes de 7 µm que foram montados em lâminas histológicas e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (H.E.) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Posteriormente, essas lâminas foram fotografadas, no aumento de 4x e de 40x, em microscópio óptico, marca *Olympus* (Tóquio, Japão), modelo BX60, o qual estava acoplado a uma câmera de vídeo, situado na UNIOESTE.

#### 4.7 ANÁLISE RADIOGRÁFICA DA MANDÍBULA

As hemimandíbulas do lado esquerdo de cada animal foram retiradas e fixadas em formol tamponado (pH 7,2) durante 48 horas. As hemimandíbulas foram

colocadas com a face lingual sobre o sensor radiográfico digital *Kodak RVG 6100* com resolução de imagem 20 pl/mm, resolução teórica do sensor 27,03 pl/mm, fibra ótica 1, dimensões de superfície ativa de 22 x 30 mm e dimensões da matriz (pixels) 1200 x 1600 (1,92 milhões) e posicionados para que as cúspides vestibulares e linguais dos primeiros molares ficassem no mesmo plano vertical. Foi utilizado aparelho de raio X GE – 1000, regulado para 15mA, 65Vp, 18 impulsos, distância foco/filme de 50 centímetros com incidência de raio X perpendicular às peças. As imagens digitalizadas foram analisadas em 3 medidas no programa *Image Tools 3.0* (*University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA*) e retirada uma média entre elas, através de uma medida linear da distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior esquerdo (NASSAR et al., 2009).

**Figura 3** - Radiografia representativa da medida da distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar da hemimandíbula esquerda com vista do lado lingual, com as cúspides vestibulares e linguais molares no mesmo plano vertical. JEC: junção cimento-esmalte; COA: crista óssea alveolar.



Fonte: própria.

#### 4.8 HISTOMORFOMETRIA DO OSSO

A medida da crista óssea alveolar foi realizada através de um microscópio acoplado a um computador, o que permitiu capturar as imagens, através do *software LazEz®*. Foi realizada uma medida da menor distância entre o ápice da crista óssea

alveolar vestibular e a junção cimento-esmalte, na objetiva de 40x, utilizando o programa analisador de imagens *Image Tools 3.0* (*University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA*). As medidas foram repetidas uma vez por dia, em três dias diferentes, e então foi realizada uma média entre os valores (MATTIA et al., 2017).

Foi realizada a quantificação celular manual (osteócitos, osteoclastos e osteoblastos) da mandíbula, através do programa *ImageJ 1.80* (*National Institute of Health, NIH, USA*), no GC e no GDP, sendo um corte por animal em 4 campos consecutivos da crista óssea alveolar vestibular, na objetiva de 40x (NASSAR et al., 2009).

## 4.9 TESTES COMPORTAMENTAIS

### 4.9.1 Labirinto em Cruz Elevado

Em todos os animais, o LCE foi realizado em dois tempos (pré e pós), sendo estes: antes da indução da DP e após, no 28<sup>o</sup> dia de experimento. O LCE consiste num aparato de dois braços abertos e opostos, os quais permitem ao roedor ver o chão, com medidas de 50 x 10 cm e dois braços fechados e opostos com paredes laterais com as mesmas medidas dos braços abertos. Os braços do labirinto foram dispostos de forma a cruzarem-se numa altura de 32 cm do solo (Figura 4).

O teste foi realizado no período da tarde no LAFEM, na UNIOESTE, sendo iniciado pelo GC, seguido pelo GDP.

Para avaliação da atividade locomotora, exploratória e ansiedade, o animal foi colocado no centro do LCE por um único pesquisador, que imediatamente retirou-se da sala. O animal foi colocado com a cabeça orientada para um dos braços fechados e foi deixado para exploração do labirinto durante um período de cinco minutos, durante os quais os comportamentos foram registrados com o auxílio de uma filmadora digital da marca *Sony* (*Sony Corporation, Tóquio, Japão*), modelo DCR-SR68 60 GB colocada acima do aparato. Os dados foram armazenados inicialmente na memória interna do equipamento, e, em seguida transferidos para um computador, onde foram gravados.

Foi realizado a limpeza da região interna (chão e paredes) do LCE com etanol a 70% antes da exposição de cada animal, para assim minimizar as pistas de odor



deixadas pelo animal anterior. Após a limpeza com etanol, foi esperado que o ambiente do LCE secasse e circulasse um pouco de ar.

Foram verificados manualmente os seguintes parâmetros motores:

- a) Frequência de levantar / elevações / *rearing*;
- b) Frequência de autolimpeza / *grooming*;
- c) Frequência de congelamento / imobilidade / *freezing*;
- d) Número de bolos fecais;
- e) Tempo de permanência nos braços abertos, expresso em segundos;
- f) Tempo de permanência nos braços fechados, expresso em segundos.

**Figura 4.** Fotografia do Labirinto em Cruz Elevado.



Fonte: própria.

#### 4.9.2 Campo Aberto / *Open Field*

Em todos os animais, o teste Campo Aberto ou *Open Field* foi realizado em dois tempos (pré e pós), sendo estes: antes da indução da DP e após, no 29º dia de experimento. O equipamento consiste em uma arena quadrada confeccionada em madeira (103 cm de largura / comprimento e 41 cm de altura), com o solo dividido em 16 quadrantes (4 centrais e 12 periféricos), com cada quadrante medindo 25 cm<sup>2</sup> (Figura 5).

O teste foi realizado no período da tarde no LAFEM, na UNIOESTE, sendo iniciado pelo GC, seguido pelo GDP.

Para avaliação da atividade locomotora, exploratória e ansiedade, o animal foi colocado cuidadosamente no centro da arena por um único pesquisador, que

imediatamente retirou-se da sala. O animal foi exposto ao teste para explorá-lo livremente por um período de cinco minutos (PELLOW et al., 1985), durante os quais os comportamentos foram registrados com o auxílio de uma filmadora digital da marca *Sony* (*Sony Corporation*, Tóquio, Japão), modelo DCR-SR68 60 GB colocada acima do aparato. Os dados foram armazenados inicialmente na memória interna do equipamento e em seguida transferidos para um computador, onde foram gravados.

Foi realizado a limpeza da região interna (chão e paredes) do equipamento com etanol a 70% antes da exposição de cada animal a fim de eliminar possível viés causado por odores e substâncias deixadas pelos ratos anteriores, evitando que o rato fosse induzido a realizar o percurso que o animal anterior realizou. Após a limpeza com etanol, foi esperado que o equipamento secasse e circulasse um pouco de ar para não ocorrer interferência no teste do rato subsequente.

Foram verificados manualmente os seguintes parâmetros motores:

- a) Frequência de levantar / elevações / *rearing*;
- b) Frequência de autolimpeza / *grooming*;
- c) Frequência de congelamento / imobilidade / *freezing*;
- d) Número de bolos fecais;
- e) Tempo de permanência no centro, expresso em segundos;
- f) Tempo de permanência na periferia, expresso em segundos.

**Figura 5.** Fotografia do *Open Field*.



Fonte: própria.

#### 4.9.3 Teste de Reconhecimento de Objetos

Em todos os animais, esse teste foi realizado em dois tempos (pré e pós), sendo estes: antes da indução da DP e após no 27, 28, 29 dias de experimento.

O equipamento consiste em uma caixa retangular, confeccionada em madeira com medidas de 60 cm de comprimento, 32 cm de largura e 45 cm de altura, com paredes e chão na cor marrom e uma parede frontal confeccionada em acrílico transparente. No chão da caixa foi colocada uma superfície branca dividida em oito quadrantes, a qual facilitou a visualização do animal. Objetos confeccionados em madeira foram utilizados, sendo: um cubo verde e um cilindro preto, possuindo as seguintes dimensões: 5 cm (cubo); 3,5 cm de altura e 5,2 cm de diâmetro (cilindro). Os objetos foram dispostos na caixa a uma distância entre eles de 24,5 cm (Figura 6 e 7).

O teste foi realizado no período da manhã no LAFEM, na UNIOESTE, sendo iniciado pelo GC, seguido pelo GDP.

A tarefa de reconhecimento de objetos foi realizada conforme descrito por Bevins e Besheer (2006), sendo composto por três fases: habituação, treinamento e teste.

Na primeira sessão, o animal foi colocado na caixa para explorar e se habituar ao ambiente durante dez minutos; no segundo dia (24 horas após a habituação), foram colocados dois objetos iguais (cubos verdes) dentro da caixa e o animal foi colocado com a cabeça direcionada para a parede da caixa em posição oposta aos

objetos, de modo que não visualizasse os objetos antes do início do experimento; o animal teve cinco minutos para explorar o ambiente e os objetos (sessão de treino). No terceiro dia (24 horas após o treinamento), cada rato foi colocado novamente na caixa de teste e um dos objetos já conhecidos (objeto A: cubo verde) foi substituído por um novo objeto (objeto B: cilindro preto) (sessão de teste). O animal teve cinco minutos para explorar o ambiente e os objetos (DO PRADO SILVA et al., 2017), período este que foi registrado e gravado com o auxílio de uma filmadora digital da marca *Sony* (*Sony Corporation*, Tóquio, Japão), modelo DCR-SR68 60 GB colocada acima do aparato. Os dados foram armazenados inicialmente na memória interna do equipamento e em seguida transferidos para um computador, onde foram gravados.

O comportamento exploratório de um objeto foi definido como cheirar ou tocar o objeto com o nariz e / ou patas dianteiras a uma distância de no mínimo 2 cm. Quaisquer outros comportamentos, como olhar em volta enquanto está sentado ou descansando contra o objeto, escalar ou sentar no objeto não foram considerados exploração (GEISS et al., 2019).

Antes da exposição de cada animal, foi realizada a limpeza da região interna (chão e paredes) da caixa e dos objetos com etanol a 70%, após isso, foi esperado que o ambiente da caixa secasse e circulasse um pouco de ar.

Foi cronometrado por um avaliador, o tempo (segundos) que o rato explorou cada objeto. Além disso, foi calculada a relação entre o tempo gasto para explorar o objeto familiar (A) e o objeto novo (B), sendo calculado a razão de discriminação (RD) do objeto através da seguinte fórmula:  $RD = \left\{ \left[ \frac{\text{tempo explorando o novo objeto}}{\text{tempo explorando o novo objeto} + \text{tempo explorando o objeto familiar}} \times 100 \right] \right\}$  (LIMA et al., 2005)

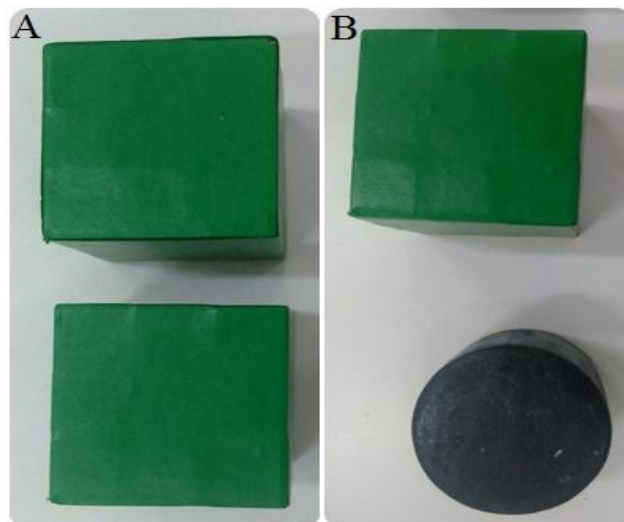
A razão de discriminação pode alcançar valores no intervalo de 0 até 1,0. O valor de 0,5 indica que o tempo de exploração aos dois objetos foi o mesmo; valores maiores que 0,5 indicam que houve uma maior exploração do objeto novo, isto é, mais de 50% do tempo total de exploração foi no objeto novo (BEVINS; BESHEER, 2006).

**Figura 6.** Fotografias do equipamento utilizado para o Teste de Reconhecimento de Objetos. Representação da sessão de treinamento (A) e da sessão de teste (B).



Fonte: própria.

**Figura 7.** Fotografias dos objetos utilizados no Teste de Reconhecimento de Objetos. A: objetos idênticos. B: objeto familiar (cubo verde) e objeto novo (cilindro preto).



Fonte:própria.

#### 4.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO HIPOCAMPO

Os encéfalos foram cortados na região do hipocampo e foi isolada a porção do lado direito, em seguida, as peças foram fixadas em metacarn durante 24 horas, posteriormente colocados em álcool 70% até o processamento. As peças passaram pela bateria n-butílico (desidratação) e xilol (diafinização), inclusão em parafina,

obtendo-se os blocos que foram cortados em micrótomo semi-automático com cortes em espessura de 5 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), os quais foram montados em lâminas histológicas e corados em Hematoxilina e Eosina (H.E.) e vermelho Congo. Posteriormente, as lâminas foram fotografadas, no aumento de 4x e de 40x, em microscópio óptico, marca *Olympus* (Tóquio, Japão), modelo BX60, o qual estava acoplado a uma câmera de vídeo, situado na UNIOESTE.

#### 4.11 IMUNO-HISTOQUÍMICA DO HIPOCAMPO

Para a realização da técnica, as lâminas foram feitas conforme descrito para análise histológica, contendo duas secções por lâmina, por grupo experimental. A desparafinação térmica foi realizada por 16 horas em estufa a 60°C (Celsius). A desparafinação química contínua foi realizada através de duas imersões. Após um banho de água, as lâminas foram imersas em uma solução de Citrato de Sódio em um recipiente fechado e colocadas em banho-maria por 30 minutos. A marcação em campo foi realizada conforme descrito por Panis et al. (2011). As secções foram delimitadas com uma caneta hidrofóbica *Dako Pen*<sup>®</sup> e as peroxidases endógenas foram bloqueadas em solução de peróxido de hidrogênio a 10% por 30 minutos, seguidas de bloqueio de ligação inespecífica por incubação em soro fetal 0,1% por 1 hora. As secções foram negativas com os anticorpos primários marca *Sigma Aldrich*, anti-beta-amiloide (1: 300), anti-tau (1: 300) e anti-CD68 (1: 300) em uma câmara úmida a 4°C (*overnight*). Após a incubação, as lâminas foram submetidas a 3 banhos (5 minutos) em PBS (Tampão fosfato-salino) e suplementadas com anticorpo secundário e mantidas por 15 minutos, lavadas novamente com PBS em jato e mais três lavagens com gota de PBS. A marcação foi revelada por incubação com 3,30-diaminobenzidina (DAB) por 15 minutos, seguida de duas lavagens com PBS, o primeiro jato e a segunda gota. Na última etapa, as secções foram levemente contra-coladas com a hematoxilina de Harry (Merck) por 30 segundos e depois lavado em água corrente, incubado em álcool 70% por 5 minutos em banho de imersão, incubado em álcool 95% por 5 minutos em banho de imersão, incubado em xilol por 5 minutos e novamente em xilol por 10 minutos. Após drenar todo o líquido, as lâminas foram montadas com bálsamo canadense e laminula. As lâminas foram fotografadas, no aumento de 4x e de 40x, em microscópio óptico, marca *Olympus* (Tóquio, Japão), modelo BX60, o qual estava acoplado a uma câmera de vídeo,

situado na UNIOESTE. Para o escore semiquantitativo, as imagens, no total de 10 para cada corte de cada animal, foram avaliadas, no aumento de 40x, por meio da ferramenta de deconvolução de cores no *Image-ProPlus* 4.0.

#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram dispostos em planilhas e analisados pelo programa *GraphPad*. Os dados foram apresentados através de médias e um valor de  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo. Foi analisada a normalidade dos dados, por meio do teste de *Shapiro-Wilk*, onde após a verificação da distribuição de normalidade, através do programa *GraphPad Prism* foi realizado o teste T de *Student* com  $p < 0.05$  para avaliar a diferença entre os grupos. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

Os dados relacionados aos testes comportamentais foram analisados através do teste *Two-Way ANOVA*.

## ARTIGO CIENTÍFICO

Periodontite pode levar a um processo inicial de neuroinflamação no hipocampo em modelos experimentais



Artigo submetido à revista *Brain, Behavior, and Immunity*

**Periodontite pode levar a um processo inicial de neuroinflamação no hipocampo em modelos experimentais**

Jossinelma Camargo Gomes<sup>a</sup>, Bianca Caroline Custodio dos Santos<sup>a</sup>, Iohana Ferreira Choptian Fiorese<sup>a</sup>, Maria Luiza Serradourada Wutzke<sup>a</sup>, Sara Cristina SagaeSchneider<sup>b</sup>, Ivo Ilvan Kerppers<sup>c</sup>, Guilherme Ribas Ataques<sup>d</sup>, Patricia OehlmeyerNassar<sup>e</sup>, Carlos Augusto Nassar<sup>e\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de pós-graduação em Biociências e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Fisioterapia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Paraná, Brasil

<sup>d</sup>Departamento de Medicina, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Paraná, Brasil

<sup>e</sup>Departamento de Odontologia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil

\* **Correspondência:** Dr. Carlos Augusto Nassar; endereço de correspondência: Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Rua Universitária, 1619 - Universitário, Cascavel, Paraná, Brasil. Telefone: +55 45 991013369. Endereço de e-mail: [canassar@yahoo.com](mailto:canassar@yahoo.com).

**Declarações de interesse:** nenhuma

**Número de palavras:** 4774

## Resumo

**Objetivo:** avaliar alterações sobre o hipocampo e comportamentos associados de ratos com periodontite experimental. **Materiais e métodos:** 20 ratos *Wistar* machos, 12 semanas de idade, divididos em: Grupo Controle (GC) e Grupo Doença Periodontal (GDP). O GDP foi induzido à periodontite experimental através da colocação de ligadura nos molares inferiores por 30 dias. Durante o experimento foram realizados três testes comportamentais, em dois tempos: antes e após a indução da periodontite, ao final foi realizada a eutanásia e a coleta dos hipocampos (análise histológica e imunológica) e das hemimandíbulas (análise histológica, histomorfométrica e radiográfica), com posterior realização dos Testes T de *Student* e *Two-Way ANOVA* para análise dos resultados. **Resultados:** O GDP apresentou maior nível de ansiedade (Teste de Labirinto em Cruz Elevado), menor habituação (Teste *Open Field*) e redução do tempo de exploração do objeto novo (Teste de Reconhecimento de Objetos) em relação ao GC ( $p < 0.05$ ). Ainda o GDP apresentou menor número de osteócitos e osteoblastos e maior atividade osteoclástica ( $p < 0.05$ ), bem como maior perda óssea alveolar morfometricamente e radiograficamente ( $p < 0.05$ ) em relação ao GC. No hipocampo, notou-se presença de placas senis, além de marcações positivas de beta-amiloide, tau e CD68 no GDP. **Conclusão:** Logo se pode concluir que a periodontite desencadeou a presença de placas senis, marcações positivas de beta-amiloide, tau e CD68, os quais, em conjunto, manifestaram um processo de neuroinflamação inicial nesses animais.

**Palavras-chave:** periodontite, ratos, hipocampo, inflamação.

**Abstract**

**Objective:** evaluate changes in the hippocampus and associated behaviors of rats with ligature-induced experimental periodontitis. **Materials and methods:** 20 male Wistar rats, 12 weeks old, divided into Control Group (CG) and Periodontal Disease Group (PDG). PDG was induced to experimental periodontitis by placing a ligature on the lower molars for 30 days. During the experiment, three behavioral tests were performed, in two stages: before and after the induction of periodontitis; at the end, the rats underwent euthanasia and the collection of the hippocampus (histological and immunological analysis) and hemimandibles (histological and radiographic analysis), with subsequent performance of Student's T-tests and Two-Way ANOVA to analyze the results. **Results:** PDG showed a higher level of anxiety (Elevated Plus Maze Test), less habituation (Open Field Test) and reduced time to explore the new object (Object Recognition Test) compared to CG ( $p < 0.05$ ). Besides, PDG had a lower number of osteocytes and osteoblasts, and higher osteoclastic activity ( $p < 0.05$ ), as well as more significant alveolar bone loss morphometrically and radiographically ( $p < 0.05$ ) compared to CG. In the hippocampus, senile plaques were noted, in addition to positive beta-amyloid, tau, and CD68 markings on PDG. **Conclusion:** Therefore, it can be concluded that periodontitis triggered the presence of senile plaques, beta-amyloid, tau, and CD68 positive markings, which, together, manifested an initial neuroinflammation process in these animals.

**Keywords:** periodontitis, mouse, hippocampus, inflammation.

## 1. Introdução

A periodontite (DP) é uma doença de caráter crônico, progressivo e destrutivo, iniciada predominantemente por bactérias gram-negativas, que colonizam a área subgengival e desencadeiam uma resposta imunoinflamatória periférica, levando à lesão do aparato dentário (GAUR; AGNIHOTRI, 2015; KAMER et al., 2016; KE et al., 2016).

Os microrganismos periodontais podem entrar na circulação, levando à bacteremia e à disseminação sistêmica, tanto em roedores quanto em humanos (KAMER et al., 2012, 2016). Assim, uma condição inicial, como a DP, se não estabilizada, pode gerar alterações, como a liberação de citocinas pró-inflamatórias (MOOTHA et al., 2016; SCHENKEIN; LOOS, 2013) e esta pode repercutir em disfunções sistêmicas (PAZOS et al., 2018; GANESH et al., 2017) e em contato com o Sistema Nervoso Central (SNC), induzir a uma resposta neuroinflamatória (ABBAYYA et al., 2015). Desse modo, pressupõe-se haver uma associação entre o estado de saúde bucal e a função cognitiva (STEWART et al., 2008).

Segundo Saito et al. (2013) e Stein et al. (2007), a redução de dentes induzida pela DP está associada a um maior risco de desenvolver demência em humanos (IDE et al., 2016), fato este reafirmado por evidências de que certas infecções bacterianas e virais podem aumentar o risco de demência (ITZHAKI et al., 2016).

A demência é uma condição cerebral degenerativa com declínio progressivo das funções cognitiva e emocional (CYPRIANI et al., 2015) e inclui várias alterações, como perda de memória, confusão mental e mudanças comportamentais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017), as quais interferem no desempenho social e profissional do indivíduo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1994). Dentre as causas associadas, inclui-se uma neurodegeneração induzida pelo aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (KONSMAN; DRUKARCH; VANDAM, 2007). Essa condição afeta

principalmente indivíduos idosos, sendo a doença de Alzheimer (DA), a causa mais comum, compreendendo 60% - 70% de todos os tipos de demências (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

A DA caracteriza-se por perda sináptica e morte neuronal em certas regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) (SELKOE, 2001), sendo iniciada no córtex entorrinal e no hipocampo (BORGES et al., 2010). Dentre as alterações neuropatológicas, vale ressaltar a presença de placas produzidas por deposição extracelular de  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) e a acumulação intraneuronal de tau hiperfosforilada, os quais formam osovelos neurofibrilares (HARDY; SELKOE, 2002). A  $A\beta$  é a responsável pela neurotoxicidade e pelo bloqueio da formação de novas memórias (SHENG et al., 2004). Assim, a DA afeta inicialmente a memória de curto prazo (LUZARDO et al., 2006).

Assim o objetivo desse estudo foi avaliar alterações sobre o hipocampo e comportamentos associados de ratos com periodontite experimental induzida por ligadura.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Amostra**

Foram utilizados 20 ratos *Wistar* adultos, com 12 semanas de idade, pesando em média 250-300 gramas, provenientes do biotério central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF) e Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia (LAFEM) da UNIOESTE. Os animais foram mantidos no biotério setorial do LAFEM, sob condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e luz (ciclo claro-escuro de 12 horas), recebendo água e ração comercial à vontade. Foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, com 10 animais em cada, onde todo o cálculo amostral foi baseado no uso do Teste T, com poder de 90% e nível de significância de

5%, bem como em prévios estudos do grupo de pesquisadores (PEDROTTI et al., 2016; MATTIA et al., 2017).

- Grupo Controle (GC), não sofreram intervenção, sendo eutanasiados no 30º dia do experimento.
- Grupo Doença Periodontal (GDP), submetidos à indução da DP, sendo eutanasiados no 30º dia do experimento.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE (com parecer de aprovação do dia 17/08/2018), estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

## **2.2 Protocolo de Indução da Doença Periodontal**

Os animais foram anestesiados com cloridato de quetamina, 0,08mL/100g (Dopalen, Sespo Indústria e Comércio, Paulínia-SP) e xilazina 0,04mL/100g (Anasedan, Sespo Indústria e Comércio, Paulínia-SP) por via intraperitoneal e posicionados em mesa operatória apropriada. Com o auxílio de uma pinça modificada e de uma sonda exploradora, foi colocado um fio de algodão número 40 ao redor dos primeiros molares inferiores. Esta ligadura atuou como irritante gengival por 30 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e o desenvolvimento da DP (NASSAR et al., 2009).

## **2.3 Análise Histológica da Mandíbula**

Após 30 dias de experimento, os animais foram eutanasiados e as hemimandíbulas direitas coletadas foram fixadas em solução de formol a 10%, por 48 horas, passaram por processo de descalcificação e processamento histológico de rotina. As amostras foram cortadas em 7 micrometros ( $\mu\text{m}$ ) e corados em Hematoxilina e Eosina (H.E.) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

## **2.4 Análise Radiográfica da Mandíbula**

Após 30 dias de experimento, os animais foram eutanasiados e as hemimandíbulas do lado esquerdo de cada animal foram retiradas e fixadas em formol tamponado (pH 7,2) durante 48 horas. As hemimandíbulas foram colocadas com a face lingual sobre o sensor radiográfico digital *Kodak RVG 6100* com resolução de imagem 20 pl/mm, resolução teórica do sensor 27,03 pl/mm, fibra ótica 1, dimensões de superfície ativa de 22 x 30 mm e dimensões da matriz (pixels) 1200 x 1600 (1,92 milhões) e posicionados para que as cúspides vestibulares e linguais dos primeiros molares ficassem no mesmo plano vertical. Foi utilizado aparelho de raio X GE – 1000, regulado para 15mA, 65Vp, 18 impulsos, distância foco/filme de 50 centímetros com incidência de raio X perpendicular às peças. As imagens digitalizadas foram analisadas em 3 medidas no programa *Image Tools 3.0* (*University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA*) e retirada uma média entre elas, através de uma medida linear da distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior esquerdo (NASSAR et al., 2009).

## **2.5 Histomorfometria do Osso**

Foi realizada uma medida da menor distância entre o ápice da crista óssea alveolar vestibular à junção cimento-esmalte no GC e no GDP, na objetiva de 40x (vezes), através do programa *Image Tools 3.0* (*University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA*). As medidas foram repetidas uma vez por dia, em três dias diferentes, e então foi realizado uma média entre os valores (MATTIA et al., 2017).

Foi realizada a quantificação celular manual (osteócitos, osteoclastos e osteoblastos), através do programa *ImageJ 1.80* (*National Institute of Health, NIH, USA*), no GC e no GDP, sendo um corte por animal, em 4 campos consecutivos da crista óssea alveolar vestibular, na objetiva de 40x (NASSAR et al., 2009).

## **2.6 Testes Comportamentais**

### **2.6.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

Em todos os animais, o LCE foi realizado em dois tempos (pré e pós): antes e depois da indução, no 28º dia de experimento. Para avaliação da atividade locomotora, exploratória e ansiedade, o animal foi colocado no centro do LCE e foi deixado para exploração por 5 minutos, a qual foi registrada por uma filmadora digital da marca *Sony* (*Sony Corporation*, Tóquio, Japão), modelo DCR-SR68 60 GB.

Foram verificados manualmente os seguintes parâmetros motores:

- a) Frequência de elevações;
- b) Frequência de autolimpeza / *grooming*;
- c) Frequência de congelamento / *freezing*;
- d) Número de bolos fecais;
- e) Tempo de permanência nos braços abertos, expresso em segundos;
- f) Tempo de permanência nos braços fechados, expresso em segundos.

### **2.6.2 *Open Field***

Em todos os animais, o *Open Field* foi realizado em dois tempos (pré e pós): antes e depois da indução, no 29º dia de experimento. Para avaliação da atividade locomotora, exploratória e ansiedade, o animal foi colocado no centro da arena e deixado para exploração por 5 minutos (Pellow et al., 1985), a qual foi registrada por uma filmadora digital da marca *Sony* (*Sony Corporation*, Tóquio, Japão), modelo DCR-SR68 60 GB.

Foram verificados manualmente os seguintes parâmetros motores:

- a) Frequência de elevações;
- b) Frequência de autolimpeza / *grooming*;



- c) Frequência de congelamento / *freezing*;
- d) Número de bolos fecais;
- e) Tempo de permanência no centro, expresso em segundos;
- f) Tempo de permanência na periferia, expresso em segundos.

### **2.6.3 Teste de Reconhecimento de Objetos**

Em todos os animais, esse teste foi realizado em dois tempos (pré e pós): antes e depois da indução, no 27, 28 e 29 dias de experimento, conforme a descrição de Bevins e Besheer (2006), sendo composto por três fases: habituação, treinamento e teste.

Na primeira sessão, o animal foi colocado na caixa e deixado por 10 minutos; no segundo dia (24 horas após), foram colocados dois objetos iguais (cubos verdes) junto ao animal por 5 minutos. No terceiro dia (24 horas após), o rato foi novamente colocado com um objeto familiar (A: cubo verde) e um objeto novo (B: cilindro preto) por 5 minutos (Do Prado Silva et al., 2017), período este registrado por uma filmadora digital da marca *Sony* (*Sony Corporation*, Tóquio, Japão), modelo DCR-SR68 60 GB.

Foi cronometrado o tempo (segundos) que o rato explorou cada objeto e calculada a relação entre o tempo gasto para explorar o objeto familiar (A) e o objeto novo (B), sendo calculado a razão de discriminação (RD) através da fórmula:  $RD = \{ [A / B + A \times 100] \}$  (LIMA et al., 2005).

### **2.7 Análise Histológica do Tecido Nervoso**

Os hipocampos do lado direito foram coletados e fixados em metacarn por 24 horas, passaram pelo processamento histológico, foram cortados em 5  $\mu$ m e corados em H.E. e vermelho Congo.

## 2.8 Imuno-histoquímica do hipocampo

Para a realização da técnica, as lâminas foram feitas conforme descrito para análise histológica, contendo duas secções por lâmina, por grupo experimental. A desparafinação térmica foi realizada por 16 horas em estufa a 60°C (Celsius). A desparafinação química contínua foi realizada através de duas imersões. Após um banho de água, as lâminas foram imersas em uma solução de Citrato de Sódio em um recipiente fechado e colocadas em banho-maria por 30 minutos. A marcação em campo foi realizada conforme descrito por Panis et al. (2011). As secções foram delimitadas com uma caneta hidrofóbica *Dako Pen*® e as peroxidases endógenas foram bloqueadas em solução de peróxido de hidrogênio a 10% por 30 minutos, seguidas de bloqueio de ligação inespecífica por incubação em soro fetal 0,1% por 1 hora. As seções foram negativas com os anticorpos primários marca *Sigma Aldrich*, anti-beta-amiloide (1: 300), anti-tau (1: 300) e anti-CD68 (1: 300) em uma câmara úmida a 4°C (*overnight*). Após a incubação, as lâminas foram submetidas a 3 banhos (5 minutos) em PBS (Tampão fosfato-salino) e suplementadas com anticorpo secundário e mantidas por 15 minutos, lavadas novamente com PBS em jato e mais três lavagens com gota de PBS. A marcação foi revelada por incubação com 3,30-diaminobenzidina (DAB) por 15 minutos, seguida de duas lavagens com PBS, o primeiro jato e a segunda gota. Na última etapa, as seções foram levemente contra-coladas com a hematoxilina de Harry (Merck) por 30 segundos e depois lavado em água corrente, incubado em álcool 70% por 5 minutos em banho de imersão, incubado em álcool 95% por 5 minutos em banho de imersão, incubado em xilol por 5 minutos e novamente em xilol por 10 minutos. Após drenar todo o líquido, as lâminas foram montadas com bálsamo canadense e laminula. As lâminas foram fotografadas, no aumento de 4x e de 40x, em microscópio óptico, marca *Olympus* (Tóquio, Japão), modelo BX60, o qual estava acoplado a uma

câmera de vídeo, situado na UNIOESTE. Para o escore semiquantitativo, as imagens, no total de 10 para cada corte de cada animal, foram avaliadas, no aumento de 40x, por meio da ferramenta de deconvolução de cores no *Image-ProPlus* 4.0.

## **2.9 Análise Estatística**

Os resultados foram dispostos em planilhas e analisados pelo programa *GraphPad*. Foi analisada a normalidade dos dados, por meio do teste de *Shapiro-Wilk*, onde após a verificação da distribuição de normalidade, através do *GraphPad Prism* foi realizado o teste T de *Student* com  $p < 0.05$  para avaliar a diferença entre os grupos. Os dados referentes aos testes comportamentais foram analisados pelo teste *Two-Way* ANOVA.

## **3. Resultados**

### **3.1 Análise Histológica da Hemimandíbula**

#### **3.1.1 Grupo Controle**

A morfologia do periodonto no GC apresentou aspectos teciduais normais, sem presença de processo inflamatório. O osso alveolar apresentou-se intacto, compacto e regular, com a crista óssea apresentando a altura na porção do terço cervical da raiz. Foi observada a presença de osteoclastos, osteócitos e osteoblastos, linhas incrementais no padrão da normalidade da remodelação óssea (**Figura 1A e 1C**).

#### **3.1.2 Grupo Doença Periodontal**

No GDP teve alterações morfológicas no periodonto. No epitélio gengival oral, juncional e sulcular, houve retração tecidual e desorganização de parte das fibras colágenas. O ligamento periodontal mostrou diminuição das fibras, células desorganizadas e infiltrado inflamatório. O osso alveolar manteve as características morfológicas do GC, exceto na crista óssea, que

estava com formato irregular com aspecto de reabsorção óssea, além de maior quantidade de osteoclastos (**Figura 1B e 1D**).

### **3.2 Análise Radiográfica e Histomorfométrica da Medida da Junção Cimento-Esmalte à Crista Óssea Alveolar**

Conforme a avaliação radiográfica constatou-se maior perda óssea alveolar no GDP comparado ao GC ( $p=0.0017$ ) (**Figura 1E**). Na análise histomorfométrica, observou-se o mesmo resultado ( $p=0.0025$ )(**Figura 1F**).

### **3.3 Análise Histomorfométrica para Quantificação de Osteócitos, Osteoblastos e Osteoclastos**

Conforme a **Tabela 1**, o GDP apresentou menor número de osteócitos e osteoblastos comparado ao GC. Ademais, o GDP teve maior atividade osteoclástica em relação ao GC ( $p<0.05$ ).

### **3.4 Análise Comportamental**

#### **3.4.1 Labirinto em Cruz Elevado**

Nas variáveis freezing e grooming não houve diferença quando comparados os grupos e os tempos. Enquanto que na variável elevações, notou-se um aumento da mesma no pós em comparação ao pré no GDP ( $p=0.0447$ ) (**Tabela 2**).

Os tempos de permanência nos braços aberto e fechado do GC não foram diferentes, contudo, verificou-se redução no tempo de permanência no braço aberto ( $p=0.0068$ ) e aumento no tempo de permanência no braço fechado ( $p=0.0090$ ) no GDP (**Tabela 2**).

O número de bolos fecais também não foi alterado quando comparados os grupos. No entanto, foi menor no tempo pós, tanto no grupo GC ( $p=0.0047$ ) quanto no GDP ( $p=0.0160$ ) (**Tabela 2**).

### **3.4.2 Open Field**

Nas variáveis freezing, grooming, elevações, tempo de permanência na periferia e no centro não houve diferença quando comparados os grupos e os tempos pré e pós (**Tabela 3**).

Na variável fezes houve diferença no GC com redução no número de bolos fecais no período pós comparado ao pré ( $p=0.0016$ ) (**Tabela 3**).

### **3.4.3 Teste de Reconhecimento de Objetos**

No tempo de exploração do objeto A (familiar), as médias do GC nos tempos pré e pós foram 19.33s (segundos) e 20.4s e as médias do GDP pré e pós foram 20.4s e 15s, respectivamente ( $p>0.05$ ).

No tempo de exploração do objeto B (novo), as médias do GC nos tempos pré e pós foram 15.44s e 13.5s, e as médias do GDP pré e pós foram 15.3s e 9.77s, respectivamente. Houve diferença estatística no GDP, com menor exploração do objeto B no tempo pós quando comparado ao pré ( $p=0.0023$ ).

Na razão de discriminação, as médias do GC nos tempos pré e pós foram 0.45 e 0.45, e, as médias do GDP pré e pós foram 0.43 e 0.44, respectivamente. Não houve diferença estatística.

## **3.5 Análise Histológica do Hipocampo**

### **3.5.1 Coloração H.E.**

Na **Figura 2** estão dispostas imagens de cortes histológicos do hipocampo na objetiva de 4x e de 40x, do GC e do GDP. Na **Figura 2A e 2B**, estão representadas pelas letras CA as regiões do hipocampo e o giro denteado (GD), onde são observados neurônios com aspectos e delineamentos normais. Na **Figura 2D**, as setas pretas demonstram neurônio piramidal (NP\*) e pode-se notar ao redor do mesmo, aspectos que representam a deposição de placa senil. Na **Figura 2C**, as setas pretas indicam a disposição de diversas células neuronais sem a presença de placas senis, notou-se a presença de vasos sanguíneos. Na **Figura 2C e 2D** são observados neurônios sensitivos, astrócitos e oligodendrócitos com aspectos normais.

### 3.5.2 Coloração Vermelho Congo

Na **Figura 2** estão dispostas imagens de cortes histológicos do hipocampo na objetiva de 4x e de 40x do GC, e, do GDP. Na **Figura 2E e 2F**, estão representadas pelas letras CA as regiões do hipocampo e giro denteado (GD), onde são observados neurônios com aspectos e delineamentos normais. Na **Figura 2H**, a seta preta demonstra neurônio piramidal (NP\*) com aspecto de placa senil, não foram observados aspectos neurofibrilares. Na **Figura 2G**, há disposição de diversas células neuronais sem a presença de placas senis, no qual também notou-se poucos neurônios dispostos no parênquima cerebral do hipocampo, enquanto que, na **Figura 2H** pode-se observar maior número de neurônios no parênquima cerebral.

## 3.6 Análise Imuno-histoquímica do Hipocampo

### 3.6.1 Análise histológica

Na **Figura 3** estão dispostas imagens de cortes histológicos do hipocampo na objetiva de 4x e de 40x do GC, e, do GDP. Nas **Figuras 3A e 3C** são observados neurônios com aspectos e delineamentos normais. Na **Figura 3D**, as setas pretas demonstram presença de macrófagos.

Na **Figura 4** estão dispostas imagens de cortes histológicos do hipocampo, na objetiva de 4x e de 40x do GC, e, do GDP. **Figura 4A e 4C** são observados neurônios com aspectos e delineamentos normais. Na **Figura 4D**, as setas pretas demonstram a deposição de tau.

Na **Figura 5** estão dispostas imagens de cortes histológicos do hipocampo na objetiva de 4x e de 40x do GC e do GDP, sendo que nas **Figuras 5A e 5C** são observados neurônios com aspectos e delineamentos normais. Na **Figura 5D**, as setas pretas demonstram presença de macrófagos.

### **3.6.1 Análise quantitativa de Beta-Amiloide, Tau e CD68**

Conforme a **Figura 3E**, o GDP apresentou atividade positiva de A $\beta$  quando comparado ao GC ( $p=0.0127$ ), a média do GC foi de 486 com desvio padrão de 342,1 e a média do GDP foi 807,1 com desvio padrão de 133,3.

Em relação à proteína tau (**Figura 4E**), o GDP apresentou atividade positiva quando comparado ao GC ( $p=0.001$ ), a média do GC foi de 1,1 com desvio padrão de 1475 e a média do GDP foi 2,331 com desvio padrão de 357,4.

Conforme a **Figura 5E**, o GDP apresentou atividade positiva de CD68 ( $p=0.003$ ), a média do GC foi de 1,1 com desvio padrão de 2,846 e a média do GDP foi 91,5 com desvio padrão de 63,03.

## **4. Discussão**

A infecção periodontal pode promover um efeito negativo sobre o estado de saúde sistêmico do organismo, podendo estar associada com doenças sistêmicas, tais como, doença cardíaca coronária, doença cerebrovascular, diabetes, doença pulmonar obstrutiva crônica e com disfunção endotelial, sendo esta última a ligação fisiopatológica entre DP e disfunção erétil

(GULATI et al., 2013; AVERSA et al., 2010; PEDROTTI et al., 2016). Segundo Spolidorio et al. (2007), o aumento no número de osteoclastos está associado à reabsorção óssea e ainda de acordo com Kurikchy et al. (2013), uma maior quantidade de osteócitos indica maturidade óssea, bem como, com o aumento da distância entre a junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar, é possível estimar se existe ou não perda óssea (KURIKCHYET al., 2013; PEDROTTI et al., 2016), logo sugere-se que a DP gerou perda óssea alveolar, como demonstrado na **Figura 1E e 1F e Tabela 1**. Corroborando com esses resultados, a avaliação microscópica descritiva revelou alterações no epitélio juncional, e, atividade de reabsorção osteoclástica no GDP, ou seja, características morfológicas típicas de periodontite (**Figura 1B e 1D**).

Existe um interesse científico crescente na hipótese de associação entre doenças bucais e sistêmicas, apoiando-se no papel da inflamação sistêmica (IDE et al., 2016), pois caso agentes patogênicos orais alcancem a corrente sanguínea e entrem em contato com o SNC e/ou haja a estimulação de produção de citocinas pró-inflamatórias no SNC, pode haver uma resposta neuroinflamatória (ABBAYYA et al., 2015; KAMER et al., 2008). Assim, tanto a infecção periodontal como a resposta imunoinflamatória, podem aumentar o risco do hospedeiro em desenvolver doenças sistêmicas (PAZOS et al., 2018; GANESH et al., 2017) e neuroinflamatórias, caso haja uma suscetibilidade genética e consequentemente, esse indivíduo apresente uma resposta imune inata exagerada no SNC, tornando-o propenso à neurodegeneração (SINGHRAO et al., 2015).

Em relação à atividade exploratória e locomotora avaliadas, no LCE observou-se no GDP, que os animais permaneceram mais tempo nos braços fechados do que nos abertos no período pós-indução (**Tabela 2**), o que pode sugerir presença de ansiedade no GDP em relação ao controle. Segundo Handley e Mithani (1984) é um comportamento natural do animal no LCE, realizar mais entradas e permanecimento por mais tempo nos braços fechados e quanto



maiores os níveis de ansiedade, menor a porcentagem de entradas nos braços abertos e de tempo gasto nos mesmos.

Conforme a variável bolos fecais, esta foi menor no tempo pós, em ambos os grupos no LCE (**Tabela 2**), enquanto que no *Open Field*, houve diminuição no número de bolos fecais no GC (**Tabela 3**), o que pode sugerir um menor nível de ansiedade se comparado ao GDP, fato que corrobora com o estudo de Pellow et al. (1985), o qual demonstrou que quanto menor o número de bolos fecais, menor o índice de ansiedade.

Ding et al. (2018) não observaram prejuízo cognitivo, no labirinto aquático de Morris, realizado após 6 semanas de indução de DP com *P. gingivalis*, em camundongos jovens (4 semanas de idade), enquanto que em camundongos de meia-idade com DP (12 meses de idade), as habilidades de aprendizado e memória foram prejudicadas. Em nosso estudo, através da razão de discriminação, verificada no teste de reconhecimento de objetos, após 4 semanas de indução, notou-se que não houve prejuízo da memória declarativa em nenhum dos grupos, ambos de ratos jovens (4 meses). Apesar de no presente estudo, a razão de discriminação não ter sido diferente entre os grupos, houve menor tempo de exploração do objeto B (novo) no tempo pós quando comparado ao pré no GDP, o que pode sugerir que apesar de ocorrer uma alteração discriminatória, esta não foi suficiente para levar a um déficit no aprendizado e memória devido, provavelmente, à idade desses animais. Conforme Herrup (2010), essas diferenças nos resultados entre ratos jovens e de meia-idade podem ser atribuídas ao envelhecimento.

Matsumura et al. (2015) observaram em ratos com Alzheimer, além de acúmulo de A $\beta$ , acúmulo precoce de CD68 nos locais de deposição de A $\beta$ . Em concordância neste trabalho, também foram observados atividade positiva de A $\beta$  (**Figura 3D**), tau (**Figura 4D**) e CD68 (**Figura 5D**) no hipocampo de ratos com DP.

Ilievskiet al. (2018) detectaram em camundongos com 7 meses e 2 semanas, que apresentavam DP induzida por *P. gingivalis*, níveis elevados de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ; microgliose e astrogliose; neurodegeneração hipocampal; expressão elevada do gene de proteína precursora de A $\beta$  (APP) e enzima beta-secretase; presença de peptídeo A $\beta$ <sub>42</sub> extracelular, proteína tau e emaranhados neurofibrilares no hipocampo. Em nosso estudo, tal como Ilievski et al. (2018), foi observado, mais precocemente (aos 4 meses de idade), presença de alterações patológicas no hipocampo de ratos com DP, tal como citado anteriormente em relação ao A $\beta$ , à proteína tau e ao CD68, além de alterações histológicas (presença de placas senis) observadas nas colorações H.E. (**Figura 2D**) e vermelho Congo (**Figura 2H**) no hipocampo do GDP.

Ishida et al. (2017) encontraram níveis cerebrais aumentados de IL-1 $\beta$  e de TNF- $\alpha$  e concentrações elevadas de LPS (lipopolissacarídeo) bacteriano no soro e no cérebro de camundongos com DP induzida por *P. Gingivalis*. No presente trabalho, notou-se atividade fagocitária no hipocampo dos animais com GDP (**Figura 5D**). Segundo Murphy (2014, p. 100), macrófagos promovem a secreção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ , então apesar de não ter sido realizado a dosagem de citocinas no presente trabalho, o nível aumentado de CD68 (**Figura 5E**) corrobora com o resultado de Ishida et al. (2017).

Apesar de alterações locomotoras e cognitivas não terem sido observadas neste trabalho (**Tabelas 2 e 3**), de acordo com Yoshiyama, Lee e Trojanowski (2013), a presença de A $\beta$  juntamente a emaranhados neurofibrilares são correlacionados ao comprometimento cognitivo, como também A $\beta$  e tau podem agir sinergicamente causando déficits comportamentais.

Assim como o A $\beta$  (**Figura 3D**), as marcações de tau (**Figura 4D**) e de CD68 (**Figura 5D**) foram positivas no GDP em relação ao controle e esse achado se traduz em um processo de

desorganização da citoarquitetura do sistema, no caso hipocampal, e juntamente aos achados histológicos (**figura 2D e 2H**), nos quais foram observados aspectos de deposição de placas senis, esses eventos caracterizam uma neuroinflamação em processo.

## **5. Conclusão**

Logo se pode concluir que a DP desencadeou a presença de placas senis, marcações positivas de beta-amiloide, tau e CD68, os quais, em conjunto, manifestaram um processo de neuroinflamação inicial nesses animais.

## 6. Referências

ABBAYYA, K.; PUTHANAKAR, N. Y.; NADUWINMANI, S. et al. Association between periodontitis and Alzheimer's disease. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 7, v. 6, p. 241-246, 2015.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV)**. 4. ed. Washington (DC): American Psychiatric Association, p. 143-147, 1994.

AVERSA, A.; BRUZZICHES, R.; FRANCOMANO, D. et al. Endothelial dysfunction and erectile dysfunction in the aging man. **International Journal of Urology**, v. 17, p. 38-47, 2010.

BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial nonmatching-to-sample learning task to study recognition memory. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1306-1311, 2006.

BORGES, S. M.; APRAHAMIAN, I.; RADANOVIC, M. et al. Psicomotricidade e retrogenese: consideracoes sobre o envelhecimento e a doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 37, n. 3, p. 131-137, 2010.

CYPRIANI, G., LUCETTI, C., CARLESI, C. et al. Depression and dementia. A review. **European Geriatric Medicine**, v. 6, n. 5, p. 479-486, 2015.

DING, Y.; REN, J.; YU, H. et al. Porphyromonas gingivalis, a periodontitis causing bacterium, induces memory impairment and age-dependent neuroinflammation in mice. **Immunity & Ageing**, n. 15, v. 6, p. 1-8, 2018.

DO PRADO SILVA, J. T.; GEISS, J. M. T.; OLIVEIRA, S. M. et al. Nanoencapsulation of lutein and its effect on mice's declarative memory. **Materials Science and Engineering: C, Materials for Biological Applications**, v. 76, p. 1005-1011, 2017.

DONOVAN, N. J.; LOCASCIO, J. J.; MARSHALL, G. A. et al. Longitudinal association of amyloid beta and anxious-depressive symptoms in cognitively normal older adults. **The American Journal of Psychiatry**, v. 175, n. 6, p. 530–537, 2018.

GANESH, P.; KARTHIKEYAN, R.; MUTHUKUMARASWAMY, A. et al. A potential role of periodontal inflammation in Alzheimer's disease: a review. **Oral Health and Preventive Dentistry**, v. 15, n. 1, p. 7-12, 2017.

GAUR, S.; AGNIHOTRI, R. Alzheimer's disease and chronic periodontitis: is there an association? **Geriatrics & Gerontology International**, v. 15, n. 4, p. 391-404, 2015.

GULATI, M.; ANAND, V.; JAIN, N. et al. Essentials of periodontal medicine in preventive medicine. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. 9, p. 988-994, 2013.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'- motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353-356, 2002.

HERRUP, K. Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 50, p.16755-16762, 2010.

IDE, M.; HARRIS, M.; STEVENS, A. et al. Periodontitis and cognitive decline in Alzheimer's disease. **PLoS One**, v. 11, n. 3, e0151081, 2016.

ILIEVSKI, V.; ZUCHOWSKA, P. K.; GREEN, S. J. et al. Chronic oral application of a periodontal pathogen results in brain inflammation, neurodegeneration and amyloid beta production in wild type mice. **PLoS One**, v. 13, n. 10, e0204941, 2018.

ISHIDA, N.; ISHIHARA, Y.; ISHIDA, K. Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of Alzheimer's disease in transgenic mice. **npj Aging and Mechanisms of Disease**, v. 3, n. 15, p. 1-7, 2017.

ITZHAKI, R. F.; LATHE, R.; BALIN, B. J. et al. Microbes and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 51, n. 4, p. 979-984, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2008.

KAMER, A. R.; CRAIG, R. G.; DASANAYAKE, A. P. et al. Inflammation and Alzheimer's disease: possible role of periodontal diseases. **Alzheimer's & Dementia**, v. 4, n. 4, 242-250, 2008.

KAMER, A. R.; FORTEA, J. O.; VIDELA, S. et al. Periodontal disease's contribution to Alzheimer's disease progression in down syndrome. **Alzheimers Dement**, n. 2, p. 49-57, 2016.

KAMER, A. R.; MORSE, D. E.; HOLM-PEDERSEN, P. et al. Periodontal inflammation in relation to cognitive function in an older adult Danish population. **Journal Alzheimer's Disease**, n. 28, p. 613-624, 2012.

KE, X.; LEI, L.; LI, H. et al. Manipulation of necroptosis by Porphyromonas gingivalis in periodontitis development. **Molecular Immunol**, n. 77, p. 8-13, 2016.

KONSMAN, J. P.; DRUKARCH, B.; VANDAM, A. M. Perivascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. **Clinical Science**, v. 112, n. 1, p. 1-25, 2007.

KURIKCHY, M. Q.; AL-RAWI, N. H.; AYOUB, R. S. et al. Histological evaluation of bone healing using organic bovine bone in combination with platelet-rich plasma (an experimental study on rabbits). **Clinical Oral Investigations**, v. 17, n. 3, p. 897-904. 2013;



LIMA, M. N.; LARANJA, D. C.; CALDANA, F. et al. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with L-deprenyl. **Experimental Gerontology**, v. 40, n. 6, p. 506-511. 2005.

LUZARDO, A. R.; GORINI, M. I. P. C.; SILVA, A. P. S. S. Características de idosos com doença de Alzheimer e seus cuidadores: uma série de casos em um Serviço de Neurogeriatria. **Texto & Contexto Enfermagem**, v.15, n. 4, p. 587-594, 2006.

MATSUMURA, A.; SUZUKI, S.; IWAHARA, N. et al. Temporal changes of CD68 and  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor expression in microglia in Alzheimer's disease-like mouse models. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 44, n. 2, p. 409-423, 2015.

MATTIA, T. M.; LEITE, M. A.; NASSAR, P. O. et al. The influence of obesity induced by monosodium glutamate in periodontal tissues of female Wistar rats with experimental periodontitis. **American International Journal of Contemporary Research**, v. 7, p. 28-40, 2017.

MOOTHA, A.; MALAIAPPAN, S.; JAVAKUMAR, N. D. et al. The effect of periodontitis on expression of interleukin-21: a systematic review. **International Journal of Inflammation**, v. 2016, ID 3507503, p. 1-8, 2016.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. 8. ed. Saraiva, 2014.

NASSAR, P. O.; NASSAR, C. A.; GUIMARÃES, M. R. et al. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *Journal Periodontal Research*, v. 44, n. 4, p. 479-488, 2009.

PANIS, C.; MAZZUCO, T. L.; COSTA, C. Z. F. et al. Trypanosoma cruzi: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 58–65, 2011.

PAZOS, P.; LEIRA, Y.; DOMÍNGUEZ, C. et al. Asociación entre enfermedad periodontal y demência. Revisión de la bibliografía. **Neurologia**, v. 33, n. 9, p. 602-613, 2018.

PEDROTTI, S.; NASSAR, P. O.; SAGAE, S. C. et al. Evaluation of the Influence of Experimental Periodontitis on the Sexual Behaviour of Male Wistar Rats. **British Journal of Medicine and Medical Research**, v. 15, n. 9, p. 1-8, 2016.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E. et al. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

SAITO, Y.; SUGAWARA, N.; YASUI-FURUKORI, N. et al. Cognitive function and number of teeth in a community-dwelling population in Japan. **Annals of General Psychiatry**, v. 12, n. 20, p. 1-6, 2013.

SCHENKEIN, H. A.; LOOS, B. G. Inflammatory Mechanisms Linking Periodontal Diseases to Cardiovascular Diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, n. 14, p. 51-69, 2013.

SELKOE, D. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 741-766, 2001.

SHENG, M.; SABATINI, B. L.; SUDHOF, T. C. Synapses and Alzheimer's Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 5, a005777, 2004.

SINGHRAO, S. K.; HARDING, A.; POOLE, S. et al. Porphyromonas gingivalis periodontal infection and its putative links with Alzheimer's disease. **Mediators Inflammation**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

SPOLIDORIO, L. C.; NASSAR, P. O.; NASSAR, C. A. et al. Conversion of Immunosuppressive Monotherapy from Cyclosporin A to Tacrolimus Reverses Bone Loss in Rats. **Calcified tissue international**, v. 81, n. 2, p. 114-123, 2007.

STEIN, P. S.; DESROSIERS, M.; DONEGAN, S. J. et al. Tooth loss, dementia and neuropathology in the Nun study. **Journal of the American Dental Association**, v. 138, n.10, p. 1314-1322, 2007.

STEWART, R.; SABBAH, W.; TSAKOS, G. et al. Oral health and cognitive function in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). **Psychosomatic Medicine**, v. 70, n. 8, p. 936-941, 2008.

YOSHIYAMA, Y.; LEE, V. M.; TROJANOWSKI, J. Q. Therapeutic strategies for tau mediated neurodegeneration. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 84, n. 7, p. 784-795, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dementia**, 12 dez. 2017.

### **Legenda das figuras**

**Figura 1** Ocorre perda óssea e de tecido conjuntivo e aumento da distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar em ratos com periodontite. Fotomicrografias

representativas de secção sagital do primeiro molar mandibular direito do GC e do GDP, em 4x e 40x, na coloração H.E. (A, B, C e D). Análise radiográfica (E) e análise histomorfométrica (F) da distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar de todos os grupos. Os valores estão expressos em pixels. Abreviações: EJ, epitélio juncional; ES, epitélio sulcular; EO, epitélio oral; LP, ligamento periodontal; JCE, junção cimento-esmalte; TC, tecido conjuntivo; COA, crista óssea alveolar; OB, osteoblasto; OC, osteoclasto; OT, osteócito; LI, linhas incrementais; Grupo Controle; GDP, Grupo Doença Periodontal.

**Figura 2 Presença de placas senis foram encontradas em ratos com periodontite.**

Fotomicrografias representativas de secção coronal do hipocampo do GC e do GDP, em 4x e 40x, na coloração H.E (A, B, C e D) e vermelho Congo (E, F, G e H). Abreviações: CA, *Corno de Ammon*; GD, giro denteado; NG, neurônio granular; AST, astrócito; OLIG, oligodendrócito; NP, neurônio piramidal; CGL, célula da glia.

**Figura 3 O marcador beta-amiloide foi positivo em ratos com periodontite.**

Fotomicrografias representativas de secção coronal do hipocampo do GC e do GDP, em 4 x e 40x (A, B, C e D). Análise quantitativa de antibeta-amiloide (E). Abreviações: GC, Grupo Controle; GDP, Grupo Doença Periodontal.

**Figura 5 O marcador tau foi positivo em ratos com periodontite.**

Fotomicrografias representativas de secção coronal do hipocampo do GC e do GDP, em 4 x e 40x (A, B, C e D). Análise quantitativa de tau (E). Abreviações: GC, Grupo Controle; GDP, Grupo Doença Periodontal.

**Figura 6 O marcador CD68 foi positivo em ratos com periodontite.**

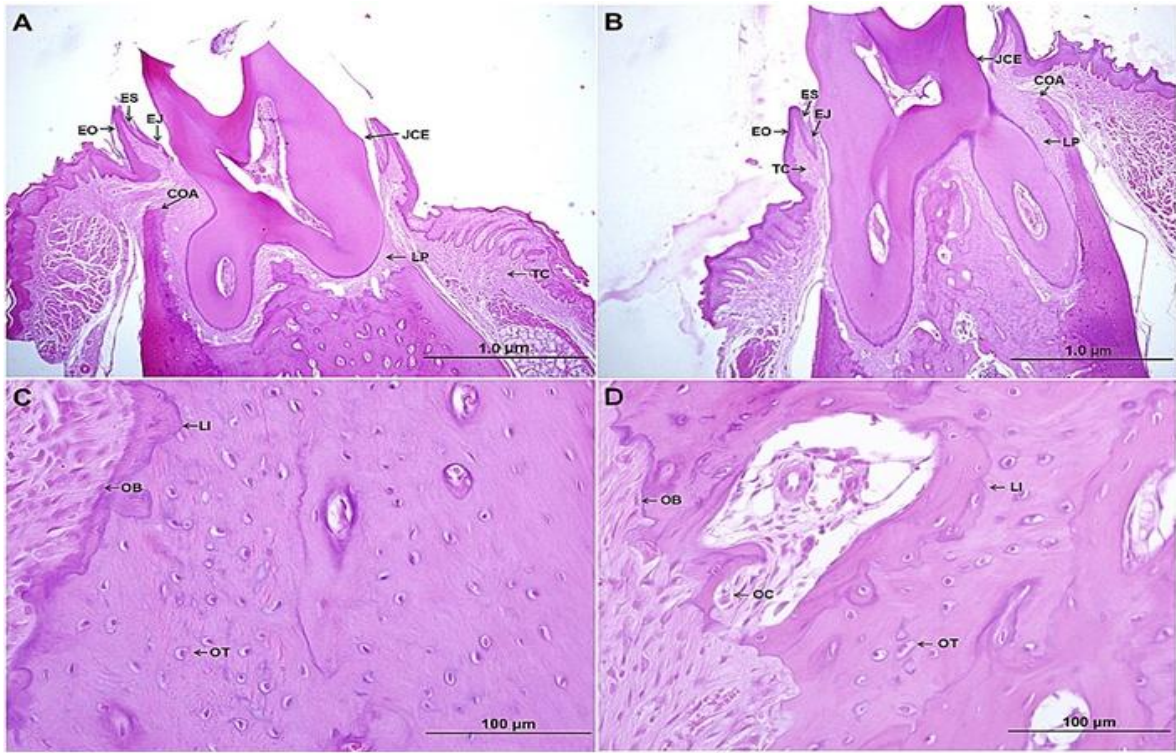
Fotomicrografias representativas de secção coronal do hipocampo do GC e do GDP, em 4 x e 40x (A, B, C, D). Análise quantitativa de CD68 (E). Abreviações: GC, Grupo Controle; GDP, Grupo Doença Periodontal.

## Legenda das Tabelas

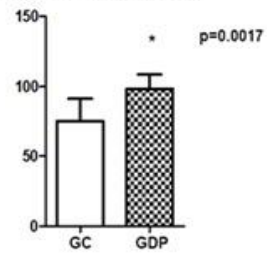
Tabela 1 Análise morfométrica da hemimandíbula direita dos ratos dos grupos experimentais para quantificação de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão da média expressos unidades.

Tabela 2 Análise dos parâmetros comportamentais no Labirinto em Cruz Elevado. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão da média. As variáveis freezing, grooming, elevações e bolos fecais estão expressos em frequência, e, as variáveis TPA e TPF estão expressos em segundos.

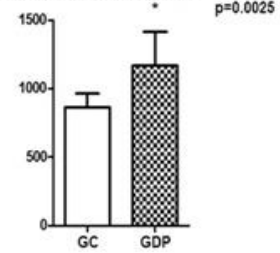
Tabela 3 Análise dos parâmetros comportamentais no *Open Field*. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão da média. As variáveis freezing, grooming, elevações e bolos fecais estão expressos em frequência e as variáveis TPC e TPP estão expressos em segundos.

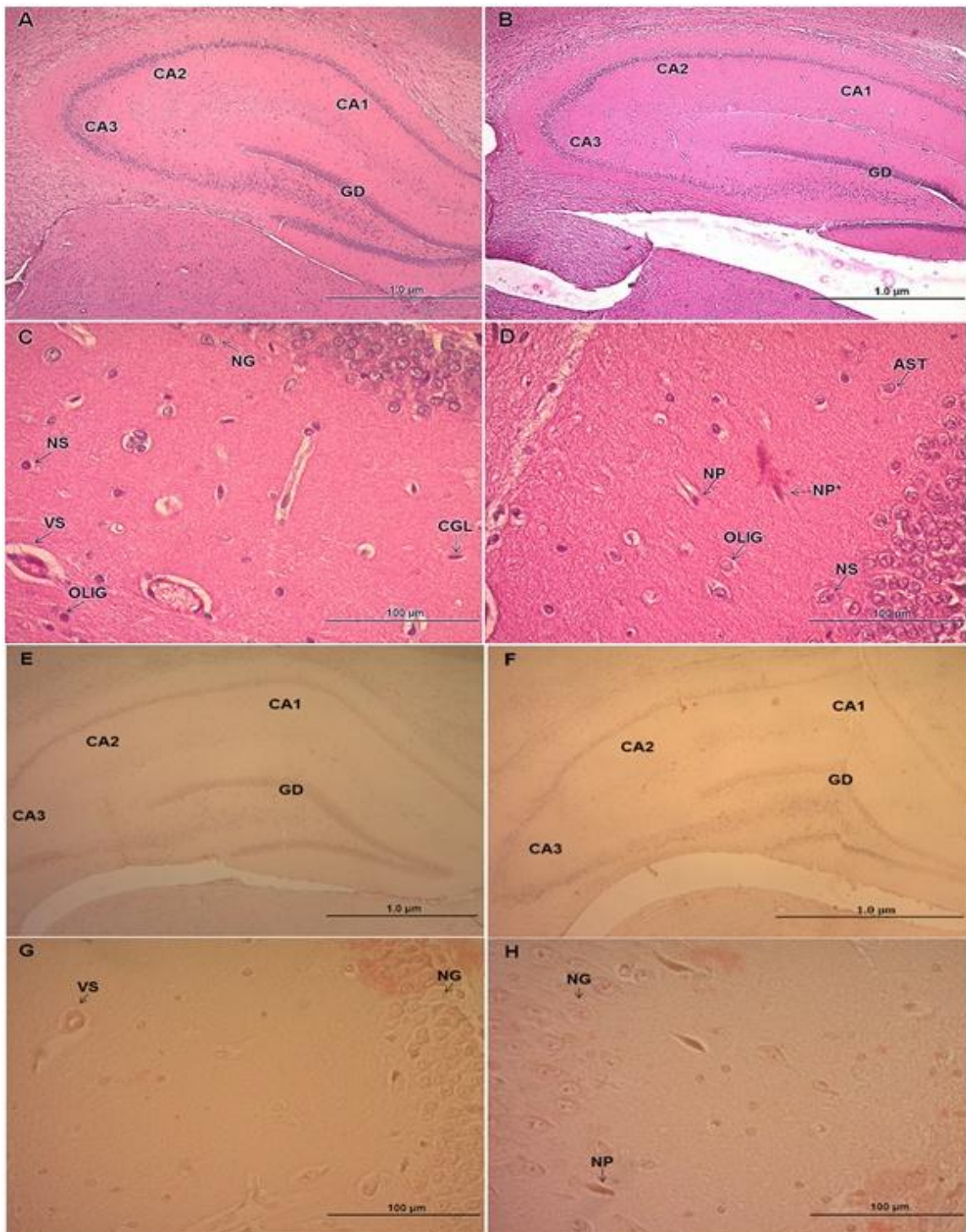


**E** Análise radiográfica da distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar

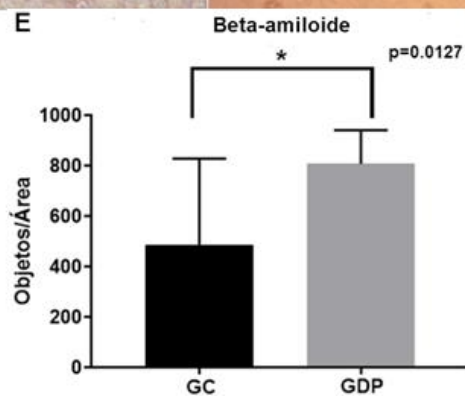
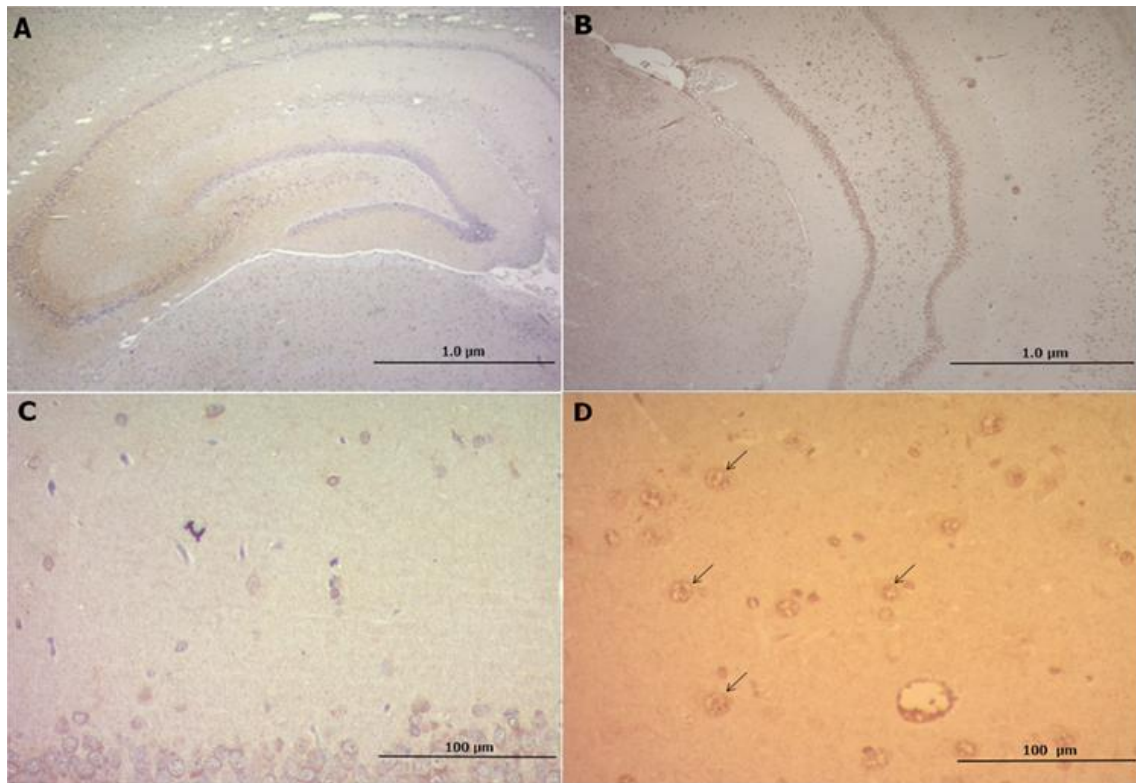


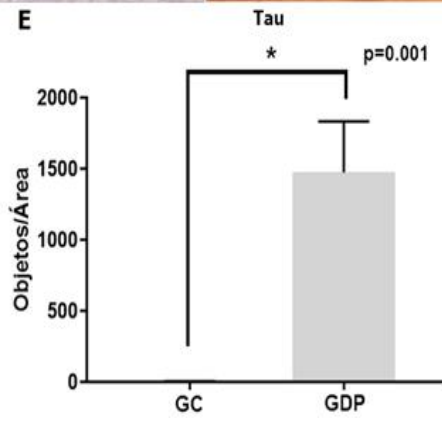
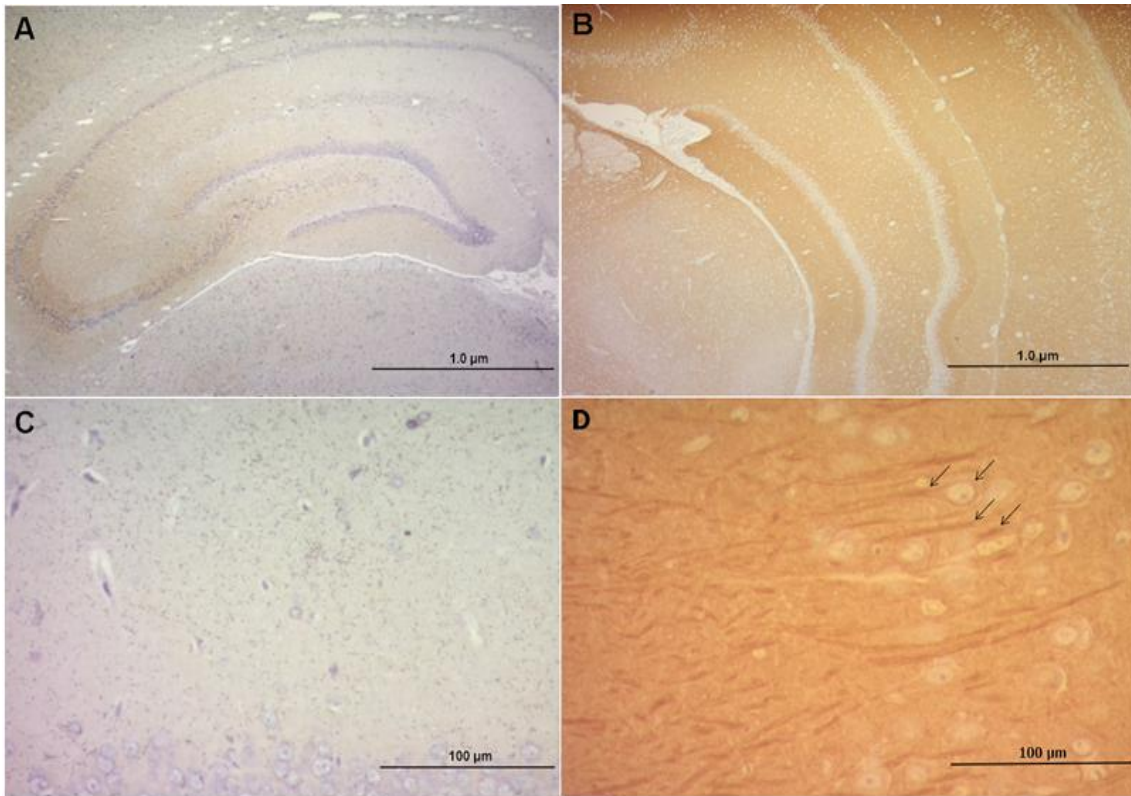
**F** Análise histomorfométrica da distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar

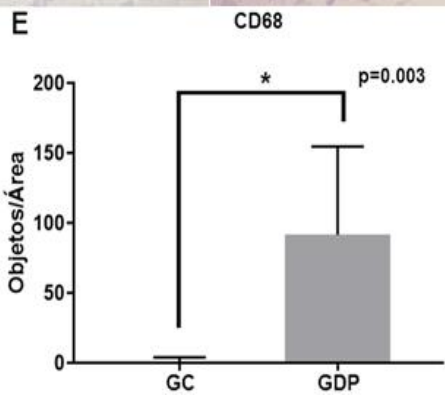
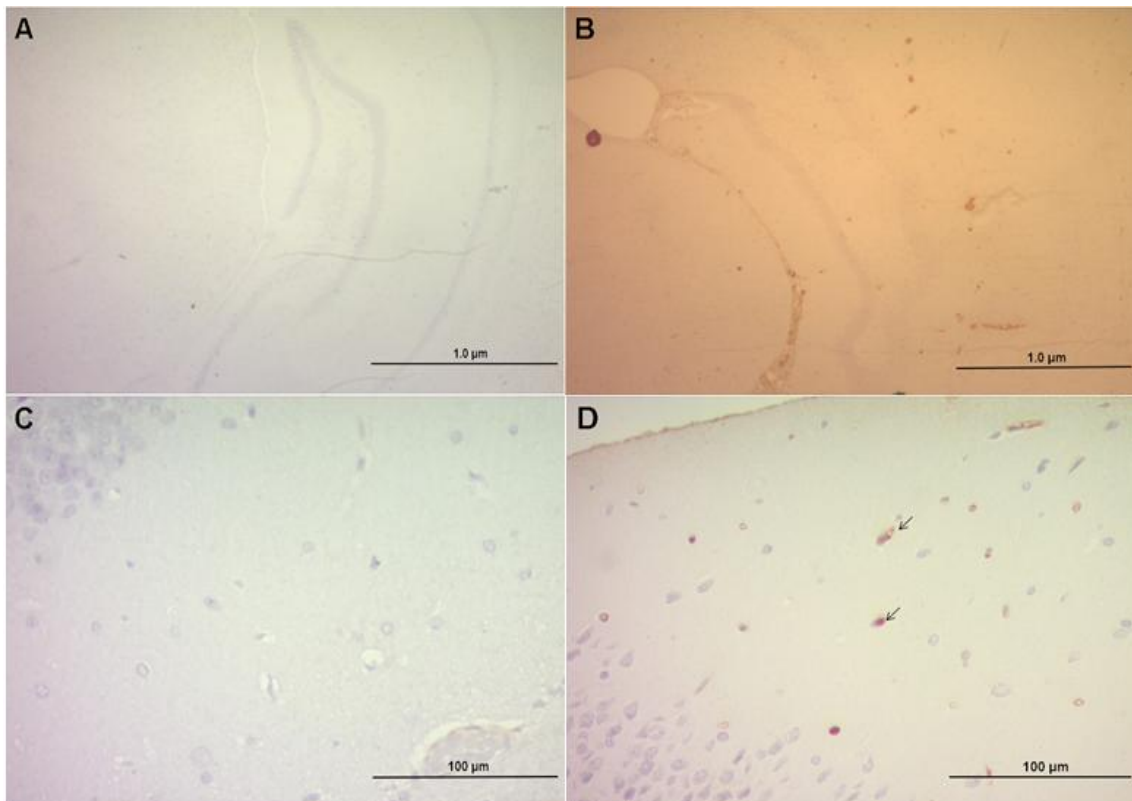












**Tabela 1 Análise Morfométrica da Hemimandíbula Direita do GC e do GDP para  
Quantificação de Osteócitos, Osteoblastos e Osteoclastos**

	Osteoblasto	Osteócito	Osteoclasto
GC	61.6±14.59 <sup>A</sup>	539.20±106.46 <sup>A</sup>	1.1±0.87 <sup>A</sup>
GDP	42.22±17.13 <sup>B</sup>	438.55±55.44 <sup>B</sup>	4.22±3.07 <sup>B</sup>

As letras diferentes referem-se às diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0.05$ ).

Abreviações: GC, Grupo Controle; GDP, Grupo Doença Periodontal.

**Tabela 2 Análise dos Parâmetros Comportamentais no Labirinto Em Cruz Elevado**

Médias $\pm$ desvio padrão da média				
Variáveis / Grupos	Pré GC	Pós GC	Pré GDP	Pós GDP
Freezing	0.85 $\pm$ 0.74 <sup>A</sup>	1.55 $\pm$ 1.42 <sup>A</sup>	1.25 $\pm$ 0.79 <sup>A</sup>	2.05 $\pm$ 1.35 <sup>A</sup>
Grooming	2.25 $\pm$ 1.63 <sup>A</sup>	1.55 $\pm$ 0.84 <sup>A</sup>	2.15 $\pm$ 2.55 <sup>A</sup>	2.12 $\pm$ 1.32 <sup>A</sup>
Elevações	20.1 $\pm$ 2.33 <sup>AB</sup>	24.55 $\pm$ 5.12 <sup>B</sup>	18.50 $\pm$ 5.01 <sup>A</sup>	24.11 $\pm$ 4.80 <sup>B</sup>
TPA	94.05 $\pm$ 43.78 <sup>AB</sup>	55.61 $\pm$ 33.12 <sup>B</sup>	132.05 $\pm$ 40.65 <sup>A</sup>	64.94 $\pm$ 47.65 <sup>B</sup>
TPF	119.38 $\pm$ 31.32 <sup>AB</sup>	127.75 $\pm$ 30.76 <sup>AB</sup>	81.38 $\pm$ 27.23 <sup>A</sup>	151.61 $\pm$ 69.18 <sup>B</sup>
Bolos fecais	1.50 $\pm$ 1.17 <sup>A</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>B</sup>	1.60 $\pm$ 1.17 <sup>A</sup>	0.55 $\pm$ 0.46 <sup>B</sup>

As letras diferentes referem-se às diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0.05$ ). Abreviações: GC, Grupo Controle; GDP, Grupo Doença Periodontal; TPA, tempo de permanência no braço aberto; TPF, tempo de permanência no braço fechado.

**Tabela 3 Análise dos Parâmetros Comportamentais no *Open Field***

Médias $\pm$ desvio padrão da média				
Variáveis / Grupos	Pré GC	Pós GC	Pré GDP	Pós GDP
Freezing	1.30 $\pm$ 1.63 <sup>A</sup>	1.00 $\pm$ 0.43 <sup>A</sup>	1.45 $\pm$ 1.30 <sup>A</sup>	0.77 $\pm$ 0.44 <sup>A</sup>
Grooming	3.15 $\pm$ 2.00 <sup>A</sup>	3.22 $\pm$ 1.43 <sup>A</sup>	2.50 $\pm$ 1.58 <sup>A</sup>	4.61 $\pm$ 3.34 <sup>A</sup>
Elevações	41.90 $\pm$ 6.19 <sup>A</sup>	40.70 $\pm$ 10.06 <sup>A</sup>	34.90 $\pm$ 9.17 <sup>A</sup>	34.44 $\pm$ 10.26 <sup>A</sup>
TPC	13.30 $\pm$ 5.14 <sup>AB</sup>	16.90 $\pm$ 8.65 <sup>B</sup>	7.40 $\pm$ 3.47 <sup>A</sup>	11.22 $\pm$ 10.59 <sup>AB</sup>
TPP	273.05 $\pm$ 14.04 <sup>A</sup>	269.15 $\pm$ 14.54 <sup>A</sup>	282.80 $\pm$ 10.93 <sup>A</sup>	279.94 $\pm$ 17.33 <sup>A</sup>
Bolos fecais	3.40 $\pm$ 2.22 <sup>A</sup>	0.11 $\pm$ 0.33 <sup>B</sup>	3.30 $\pm$ 1.70 <sup>A</sup>	2.00 $\pm$ 2.12 <sup>AB</sup>

As letras diferentes referem-se às diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0.05$ ). Abreviações: GC, Grupo Controle; GDP, Grupo Doença Periodontal; TPC, tempo de permanência no centro; TPP, tempo de permanência na periferia.

### Highlights

- Ratos com periodontite não apresentaram alterações locomotoras nem de cognição e aprendizado.
- Ratos com periodontite apresentaram maior nível de ansiedade quando expostos ao Labirinto em Cruz Elevado, e, menor habituação ao *Open Field* em relação a animais controle.
- Ratos com periodontite apresentaram placas senis e marcadores, beta-amiloide, tau e CD68, positivos no hipocampo.

## **CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES FINAIS**

Nessa pesquisa, vale destacar a relevância quanto à patogênese e etiologia de doenças como periodontite e Alzheimer, as quais apresentam semelhanças, como também podem possuir uma relação/consequência entre as mesmas e necessitam de mais estudos para a sua compreensão para posteriormente, buscar por alternativas intervencionistas, nessas condições.

Esses achados/presença de placas senis, marcações de beta-amiloide, tau e CD68 em animais com periodontite reafirmam a importância da interdisciplinaridade no meio acadêmico e científico, e, também, na saúde.

Dentre as dificuldades, destaca-se o apoio financeiro, o que, em geral, limitou o estudo.



## REFERÊNCIAS GERAIS

ABBAYYA, K.; PUTHANAKAR, N. Y.; NADUWINMANI, S. et al. Association between periodontitis and Alzheimer's disease. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 7, n. 6, p. 241-246, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26199919>. Acesso em: 4 mai. 2018.

AGGLETON, J. P.; PEARCE, J. M. Neural systems underlying episodic memory: insights from animal research. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 356, n. 1413, p. 1467-1482, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1088529/>. Acesso em: 20 jun. 2019.

ALVES, C.; ANDION, J.; BRANDÃO, M.; MENEZES, R. mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.51, n. 7, p. 1050-1057, 2007. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27302007000700005](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302007000700005). Acesso em: 28 dez. 2019.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV)**. 4. ed. Washington (DC): American Psychiatric Association, p. 143-147, 1994.

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cognitive Processing**, v. 13, n. 2, p. 93-110, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3332351/>. Acesso em: 4 jul. 2019.

BANNERMAN, D. M.; RAWLINS, J. N.; MCHUGH, S. B. et al. Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 273-283, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15225971>. Acesso em: 25 jul. 2019.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BERLYNE, D. E. Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour. **British Journal of Psychology**, v. 41, p. 68-80, 1950. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.2044-8295.1950.tb00262.x>. Acesso em: 24 jul. 2019.

BEST, P. J.; WHITE, A. M.; MINAI, A. Spatial processing in the brain: the activity of hippocampal place cells. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 459-486, 2001. Disponível em: [https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.neuro.24.1.459?rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed&url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=neuro](https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.neuro.24.1.459?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=neuro). Acesso em: 25 jul. 2019.

BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial nonmatching-to-sample learning task to study recognition memory. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1306-1311, 2006. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.205>. Acesso em: 10 ago. 2018.

BROWN, E. S.; RUSH, A. J.; MCEWEN, B. Hippocampal remodelling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders. **Neuropsychopharmacol**, v. 21, n. 4, p. 474-484, 1999. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1395378>. Acesso em: 25 jul. 2019.

BOLLES, R. C.; FANSELOW, M. A perceptual-recuperative model of fear and pain. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 3, n. 2, p. 291-301, 1980. Disponível em: <https://philpapers.org/rec/BOLAPM>. Acesso em: 19 jul. 2019.

BOLLES, R. C.; RILEY, A. L. Freezing as an avoidance response: Another look at the operant-respondent distinction. **Learning & Motivation**, v. 4, n. 3, p. 268-275, 1973. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0023969073900167>. Acesso em: 10 jul. 2019.

BOON, H. S.; WONG, A. H. C. Kava: a test case for Canada's new to natural health products. **Canadian Medical Association Journal**, v. 169, n. 11, p. 1163-1164, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC264955/>. Acesso em: 7 jul. 2019.

BORGES, S. M.; APRAHAMIAN, I.; RADANOVIC, M. et al. Psicomotricidade e retrogenese: consideracoes sobre o envelhecimento e a doença de Alzheimer. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 37, n. 3, p. 131-137, 2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-60832010000300007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-60832010000300007). Acesso em: 20 set. 2019.

BURGER, C. Region-Specific Genetic Alterations in the Aging Hippocampus: Implications For Cognitive Aging. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 2, n. 140, p. 1-12, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2967426/>. Acesso em: 8 ago. 2019.

CARLINI, E. A.; CONSTAR, J. D. P.; SILVA-FILHO, A. R. et al. Pharmacology Of Lemon-Grass (*Cymbopogon citrates* Stapf.). Effects of teas prepared from leaves on laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, n. 1, p. 37-64, 1986. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378874186900723?via%3Dihub>. Acesso em: 15 jun. 2019.

CAROBREZ, A. P.; BERTOGLIO, L. J. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 8, p. 1193-1205, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763405000680?via%3Dihub>. Acesso em: 9 jul. 2019.

CERAJEWSKA, T. L.; DAVIES, M.; WEST, N. X. Periodontitis: a potential risk factor for Alzheimer's disease. **British Dental Journal**, v. 218, n. 1, p. 29-34, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25571822>. Acesso em: 2 out. 2019.

CESTARI, J. A.; FABRI, G. M.; KALIL, J. et al. Oral Infections and Cytokine Levels in Patients with Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment Compared with Controls. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 52, n. 4, p. 1479-1485, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27104907>. Acesso em: 8 nov. 2019.

CHOLERIS, E.; THOMAS, A.W.; KAVALIERS, M. et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 235-260, 2001. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149-7634\(01\)00011-2](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149-7634(01)00011-2). Acesso em: 5 jun. 2019.

CIEZA, A.; ANCZEWSKA, M.; AYUSO- MATEOS, J. et al. Understanding the impact of brain disorders: towards a 'Horizontal Epidemiology' of psychosocial difficulties and their determinants. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1-24, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4564202/>. Acesso em: 29 jul. 2018.

COENEN, M.; CABELLO, M.; UMLAUF, S. et al. Psychosocial difficulties from the perspective of persons with neuropsychiatric disorders. **Disability and**

**Rehabilitation**, v. 38, n. 12, p. 1134-1145, 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/09638288.2015.1074729>. Acesso em: 2 ago. 2018.

COREY-BLOOM, J.; THAL, L.; GALASKO, D. et al. Diagnosis and evaluation of dementia. **Neurology**, 1995;45, n. 2, p. 211-218, 1995. Disponível em: <https://n.neurology.org/content/45/2/211>. Acesso em: 20 set. 2019.

CORTÉS-VIEYRA, R.; ROSALES, C.; QUEROL, E. U. Neutrophil functions in periodontal homeostasis. **Journal of Immunology Research**, v. 16, ID 1396106, p. 1-9, 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2016/1396106/>. Acesso em: 25 jul. 2018.

CRUSIO, W. E. Genetic dissection of mouse exploratory behaviour. **Behavioural Brain Research**, v. 125, n. 1-2, p. 127-132, 2001. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166-4328\(01\)00280-7](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166-4328(01)00280-7). Acesso em: 2 jul. 2019.

CRUZ, A. P. M.; FREI, F.; GRAEFF, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 49, n. 1, p. 171-176, 1994. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0091305794904723?via%3Dihub>. Acesso em: 22 jul. 2019.

CYPRIANI, G., LUCETTI, C., CARLESI, C. et al. Depression and dementia. A review. **European Geriatric Medicine**, v. 6, n. 5, p. 479-486, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878764915001552>. Acesso em: 7 abr. 2018.

DANTZER, R.; KONSMAN, J. P.; BLUTHE, R. M. et al. Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? **Autonomic Neuroscience**, v. 85, n. 1-3, p. 60-65, 2000. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1566-0702\(00\)00220-4](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1566-0702(00)00220-4). Acesso em: 2 ago. 2018.

DEACON, R. M. J. AND RAWLINS, J. N. P. Learning Impairments of Hippocampal-Lesioned Mice in a Paddling Pool. **Behavioural Neuroscience**, v. 116, n. 3, p. 472-478, 2002. Disponível em: <https://psycnet.apa.org/record/2002-02878-012>. Acesso em: 9 jul. 2019.

DI BENEDETTO, A.; GIGANTE, I.; COLUCCI, S. et al. Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss. **Clinical and Developmental Immunology**, v.

2013, ID 503754, p. 1-7, 2013. Disponível em:  
<https://www.hindawi.com/journals/jir/2013/503754/>. Acesso em: 5 mai. 2018.

DO PRADO SILVA, J. T.; GEISS, J. M. T.; OLIVEIRA, S. M. et al. Nanoencapsulation of lutein and its effect on mice's declarative memory. **Materials Science and Engineering: C, Materials for Biological Applications**, v. 76, p. 1005-1011, 2017. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116327643?via%3Dihub>. Acesso em: 10 ago. 2018.

DRISCOLL, I.; SUTHERLAND, R. J. The Aging Hippocampus: Navigating Between Rat and Human Experiments Sutherland Reviews in the Neurosciences. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 2, p. 87-121, 2005. Disponível em:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15957576>. Acesso em: 4 nov. 2019.

DUZEL, E.; VAN PRAAG, H.; SENDTNER, M. Can physical exercise in old age improve memory and hippocampal function? **Brain**, v. 139, n. 3, p. 662-673, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26912638>. Acesso em: 5 ago. 2019.

DYE, B. A. Global periodontal disease epidemiology. **Periodontol**, v. 58, p. 10-25, 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0757.2011.00413.x>. Acesso em: 2 jun. 2018.

EACOTT, M. J.; NORMAN, G. Integrated memory for object, place, and context in rats: a possible model of episodic-like memory? **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 8, p. 1948-1953, 2004. Disponível em:  
<https://www.jneurosci.org/content/24/8/1948.long>. Acesso em: 14 jun. 2019.

EILAM, D. Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. **Behavioural Brain Research**, v. 142, n. 1-2, p. 53-62, 2003. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432802003820?via%3Dihub>. Acesso em: 19 jun. 2019.

EKE, P. I.; DYE, B. A.; WEI, L. et al. Update on prevalence of periodontitis in adults in the united states: NHANES 2009 - 2012. **Journal Periodontology**, v. 86, n. 5, p. 611-622, 2015. Disponível em:  
<https://aap.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1902/jop.2015.140520>. Acesso em: 5 mai. 2018.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1:Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, v. 31, n. 1, p. 47-

59, 1988. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016643288890157X?via%3Dihub>.

Acesso em: 12 jun. 2019.

FANSELOW, M. S.; LESTER, L. S. A functional behavioristic approach to aversively motivated behavior: Predatory imminence as a determinant of the topography of defensive behavior. In R. C. Bolles & M. D. Beecher (Eds.). **Evolution and Learning**, p. 185-211, 1988. Disponível em: <https://psycnet.apa.org/record/1987-98812-010>. Acesso em: 12 jul. 2019.

GANESH, P.; KARTHIKEYAN, R.; MUTHUKUMARASWAMY, A. et al. A potential role of periodontal inflammation in Alzheimer's disease: a review. **Oral Health and Preventive Dentistry**, v. 15, n. 1, p. 7-12, 2017. Disponível em: <https://ohpd.quintessenz.de/index.php?doc=abstract&abstractID=37708>. Acesso em: 22 jul. 2018.

GARCÍA-MORENO, L. M.; CONEJO, N. M.; CAPILLA, A. et al. Chronic ethanol intake and object recognition in young and adult rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 26, v. 5, p. 831-837, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12369254>. Acesso em: 25 jul. 2019.

GARCIA, A. M. B.; CARDENAS, F. P.; MORATO, S. The effects of pentylentetrazol, chlordiazepoxide and caffeine in rats tested in the elevated plus-maze depend on the experimental illumination. **Behavioural Brain Research**, v. 217, n. 1, p. 171-177, 2011. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166-4328\(10\)00670-4](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166-4328(10)00670-4). Acesso em: 6 jul. 2019.

GARLET, G. P.; TROMBONE, A. P.; MENEZES, R. et al. The use of chronic gingivitis as reference status increases the power and odds of periodontitis genetic studies: a proposal based in the exposure concept and clearer resistance and susceptibility phenotypes definition. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 39, n. 4, p. 323-332, 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-051X.2012.01859.x>. Acesso em: 20 jul. 2018.

GAUR, S.; AGNIHOTRI, R. Alzheimer's disease and chronic periodontitis: is there an association? **Geriatrics & Gerontology International**, v. 15, n. 4, p. 391-404, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ggi.12425>. Acesso em: 4 jun. 2018.

GARLET, G. P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a reappraisal from host defense and tissue destruction view points. **Journal of Dental**

**Research**, v. 89, n. 12, p. 1349- 1363, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20739705>. Acesso em: 8 nov. 2019.

GEISS, J. M. T.; SAGAE, S. C.; PAZ, E. D. R. et al. Oral administration of lutein attenuates ethanol-induced memory deficit in rats by restoration of cholinergic function. **Physiology & Behavior**, v. 204, n. 15, p. 121-128, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031938418310175?via%3Dihub>. Acesso em: 11 jun. 2019.

GENCO, R.; OFFENBACHER, S.; BECK J. Periodontal disease and cardiovascular disease: epidemiology and possible mechanisms. **Journal of the American Dental Association**, v. 133, p. 14-22, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12085720>. Acesso em: 22 jul. 2018.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2007.

GIVENS, J. L.; LOPEZ, R. P.; MAZOR, K. M. et al. Sources of stress for family members of nursing home residents with advanced dementia. **Alzheimer's Disease and Associated Disorders**, v. 26, n. 3, p. 254-259, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3288670/>. Acesso em: 3 ago. 2018.

GOSSELIN, D.; RIVEST, S. Role of IL-1 and TNF in the brain: twenty years of progress on a Dr Jekyll/Mr Hyde duality of the innate immune system. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 3, p. 281-289, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889159106004235?via%3Dihub>. Acesso em: 28 jul. 2018.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 1, p. 30-44, 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri3785>. Acesso em: 2 ago. 2018.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat 1. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, v. 18, n. 3, p. 385-403, 1934. Disponível em: <https://psycnet.apa.org/record/1935-01733-001>. Acesso em: 22 jul. 2019.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6149466>. Acesso em: 2 jul. 2019.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353-356, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12130773>. Acesso em: 22 set. 2019.

HANNESSON, D. K.; VACCA, G.; HOWLAND, J. G. et al. Medial prefrontal cortex is involved in spatial temporal order memory but not spatial recognition memory in tests relying on spontaneous exploration in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 153, n. 1, p. 273-285, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016643280300473X?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jul. 2019.

HILL, M. N.; GORZALKA, B. B. Increased sensitivity to restraint stress and novelty-induced emotionality following long-term, high dose cannabinoid exposure. **Psychoneuroendocrinology**, v. 31, n. 4, p. 526-536, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306453005002477?via%3Dihub>. Acesso em: 21 jul. 2019.

HO, Y. H.; LIN, Y. T.; WU, C. W. et al. Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 46, p. 1-14, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26100815>. Acesso em: 2 nov. 2019.

HOGG, S. A review of the validity and variability of the elevated plus maze as an animal model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 21-30, 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0091305795021264?via%3Dihub>. Acesso em: 22 jul. 2019.

HUOT, R. L.; PLOTSKY, P. M.; LENOX, R. H. et al. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. **Brain Research**, v. 950, n. 1-2, p. 52-63, 2002. Disponível em: [https://scite.ai/reports/10.1016/s0006-8993\(02\)02985-2](https://scite.ai/reports/10.1016/s0006-8993(02)02985-2). Acesso em: 20 jul. 2019.

IDE, M.; HARRIS, M.; STEVENS, A. et al. Periodontitis and cognitive decline in Alzheimer's disease. **PLoS One**, v. 11, n. 3, e0151081, 2016. Disponível em:



<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0151081>. Acesso em: 3 ago. 2018.

ITZHAKI, R. F.; LATHE, R.; BALIN, B. J. et al. Microbes and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 51, n. 4, p. 979-984, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26967229>. Acesso em: 25 ago. 2019.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D. M.; DE SOUZA, T. M. et al. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 635-636, 1998. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/31371>. Acesso em: 3 mai. 2018.

IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M.; MEDINA, J. H. et al. Pharmacological findings on the biochemical bases of memory processes: a general view. **Neural Plasticity**, v. 11, p. 159-189, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2567046/>. Acesso em: 11 jul. 2019.

JELLINGER, K. A. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. **Journal of Neural Transmission**, v. 116, p. 1111-1162, 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00702-009-0240-y>. Acesso em: 29 jul. 2019.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2008.

KALARIA, R. N.; MAESTRE, G. E.; ARIZAGA, R. et al. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. **The Lancet Neurology**, v. 7, n. 8, p. 812-826, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18667359>. Acesso em: 7 abr. 2019.

KAMER, A. R.; CRAIG, R. G.; DASANAYAKE, A. P. et al. Inflammation and Alzheimer's disease: possible role of periodontal diseases. **Alzheimer's & Dementia**, v. 4, n. 4, p. 242-250, 2008. Disponível em: <https://europepmc.org/abstract/med/18631974>. Acesso em: 24 jul. 2018.

KAMER, A. R.; FORTEA, J. O.; VIDELA, S. et al. Periodontal disease's contribution to Alzheimer's disease progression in down syndrome. **Alzheimers Dement**, v. 4, n. 2, p. 49-57, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27239536>. Acesso em: 8 nov. 2019.

KAMER, A. R.; MORSE, D. E.; HOLM-PEDERSEN, P. et al. Periodontal inflammation in relation to cognitive function in an older adult Danish population. **Journal Alzheimer's Disease**, v. 28, n. 3, p. 613-624, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22045483>. Acesso em: 7 out. 2019.

KAO, L. T.; SHEU, J. J.; LIN, H. C. et al. Association between sepsis and dementia. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 22, n. 9, p. 1430-1433, 2015. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0967-5868\(15\)00171-X](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0967-5868(15)00171-X). Acesso em: 26 ago. 2018.

KE, X.; LEI, L.; LI, H. et al. Manipulation of necroptosis by Porphyromonas gingivalis in periodontitis development. **Molecular Immunol**, v. 77, p. 8-13, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27449906>. Acesso em: 26 nov. 2019.

KIM, J. J.; FANSELOW, M. S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, v. 256, n. 5057, p. 675-677, 1992. Disponível em: <https://science.sciencemag.org/content/256/5057/675>. Acesso em: 14 jul. 2019.

KIVISAARI, S. L.; PROBST, A.; TAYLOR, K. I. The Perirhinal, Entorhinal, and Parahippocampal Cortices and Hippocampus: An Overview of Functional Anatomy and Protocol for Their Segmentation in MR Images In fMRI. **Springer Berlin Heidelberg**, v. 2, n. 19, p. 239-267, 2013. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-Perirhinal%2C-Entorhinal%2C-and-Parahippocampal-and-Kivisaari-Probst/7b8532cc0576e5c9a210b48b5567855a3d4dd348>. Acesso em: 24 jul. 2019.

KONSMAN, J. P.; DRUKARCH, B.; VANDAM, A. M. Perivascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. **Clinical Science**, v. 112, n. 1, p. 1-25, 2007. Disponível em: <http://www.clinsci.org/content/112/1/1.long>. Acesso em: 27 jul. 2018.

KUMAR, A.; SINGH, A.; EKAVALI. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **Pharmacol Reports**, v. 67, n. 2, p. 195-203, 2015. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1734-1140\(14\)00288-6](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1734-1140(14)00288-6). Acesso em: 14 mai. 2018.

LEISHMAN, S. J.; SEYMOUR, G. J.; FORD, P. J. Local and systemic inflammatory responses to experimentally induced gingivitis. **Disease Markers**, v. 35, n. 5, p. 543-549, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3817648/>. Acesso em: 28 jul. 2018.

LEVER, C.; BURTON, S.; O'KEEFE, J. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 1-2, p. 111-133, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16703946>. Acesso em: 23 jul. 2018.

LIMA, M. N.; LARANJA, D. C.; CALDANA, F. et al. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with L-deprenyl. **Experimental Gerontology**, v. 40, n. 6, p. 506-511. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15935594>. Acesso em: 18 jul. 2018.

LINS, R. D. A. U.; PEQUENO, M. T.; MELO, J. P. L. C. et al. Atividade ósteo-reabsortiva na doença periodontal: o papel das citocinas e prostaglandinas. **Revista de Cirurgia e Traumatologia**, v. 7, n. 2, p. 29-36, 2007. Disponível em: <http://www.revistacirurgiabmf.com/2007/v7n2/v7n23.pdf>. Acesso em: 23 abr. 2018.

LIU, T. C.; SHEU, J. J.; LIN, H. C. et al. Increased risk of parkinsonism following chronic periodontitis: a retrospective cohort study. **Movement Disorders**, v. 28, n. 9, p. 1307-1308, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mds.25359>. Acesso em: 5 mai. 2018.

LUZARDO, A. R.; GORINI, M. I. P. C.; SILVA, A. P. S. S. Características de idosos com doença de Alzheimer e seus cuidadores: uma série de casos em um Serviço de Neurogeriatria. **Texto & Contexto Enfermagem**, v. 15, n. 4, p. 587-594, 2006. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-07072006000400006&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-07072006000400006&script=sci_abstract&tlng=pt). Acesso em: 17 set. 2019.

MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia funcional**. 2. ed. São Paulo: Atheneu; 2006.

MARQUES, T.C.N.; SARRACINI, K. L.; CORTELLAZZI, K. L. et al. The impact of oral health conditions, socioeconomic status and use of specific substances on quality of life of addicted persons. **BMC Oral Health**, n. 15, v. 38, p. 1-3, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4382833/>. Acesso em: 24 jul. 2018.

MARTINEZ, J. C.; CARDENAS, F.; LAMPREA, M. et al. The role of vision and proprioception in the aversion of rats to the open arms of an elevated plus maze. **Behavioral Processes**, v. 60, n. 1, p. 15-26, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S037663570200102X?via%3Dihub>. Acesso em: 25 jul. 2018.

MATTIA, T. M.; LEITE, M. A.; NASSAR, P. O. et al. The influence of obesity induced by monosodium glutamate in periodontal tissues of female Wistar rats with experimental periodontitis. **American International Journal of Contemporary**

**Research**, v. 7, p. 28-40, 2017. Disponível em:

[http://www.aijcrnet.com/journals/Vol\\_7\\_No\\_3\\_September\\_2017/5.pdf](http://www.aijcrnet.com/journals/Vol_7_No_3_September_2017/5.pdf). Acesso em: 11 set. 2018.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance.

**Brain Research**, v. 886, n. 1-2, p. 172-189, 2000. Disponível em:

[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006-8993\(00\)02950-4](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006-8993(00)02950-4). Acesso em: 9 jul. 2019.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease.

**Neurobiology of Aging**, v. 22, n. 6, p. 799-809, 2001. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11754986>. Acesso em: 28 abr. 2018.

MELLO, P. B.; BENETTI, F.; CAMMAROTA, M. et al. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. **Anais da**

**Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 2, p. 301-309, 2008. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-37652008000200008](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652008000200008). Acesso em: 24 nov. 2019.

MILNER, B.; SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. Cognitive neuroscience and the study of memory. **Neuron**, v. 20, n. 3, p. 445-468, 1998. Disponível em:

[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896-6273\(00\)80987-3](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896-6273(00)80987-3). Acesso em: 18 jul. 2019.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative Physiology and Psychology**, v. 48, n. 2, p. 254-260, 1955. Disponível em: <https://psycnet.apa.org/record/1956-04045-001>. Acesso em: 1 jul. 2019.

MONTGOMERY, K. C.; MONKMAN, J. A. The relation between fear and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, n. 2, p. 132-136, 1955. Disponível em: <https://psycnet.apa.org/record/1956-00462-001>. Acesso em: 1 jul. 2019.

MOOTHA, A.; MALAIAPPAN, S.; JAVAKUMAR, N. D. et al. The effect of periodontitis on expression of interleukin-21: a systematic review. **International Journal of Inflammation**, v. 2016, ID 3507503, p. 1-8, 2016. Disponível em:

<https://www.hindawi.com/journals/iji/2016/3507503/>. Acesso em: 27 jul. 2018.

MORRIS, R. G. M. Spatial Localization does not require the presence of local cues.

**Learning and Motivation**, n. 12, n. 2, p. 239-260, 1981. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0023969081900205>. Acesso em: 13 ago. 2019.

MUMBY, D.G. Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 127, n. 1-2, p. 159-181, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432801003679?via%3Dihub>. Acesso em: 2 abr. 2019.

NAGPAL, R.; YAMASHIRO, Y.; IZUMI, Y. The Two-Way Association of Periodontal Infection with Systemic Disorders: An Overview. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1-9, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4539125/>. Acesso em: 18 jul. 2018.

NASSAR, P. O.; NASSAR, C. A.; GUIMARÃES, M. R. et al. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. **Journal Periodontal Research**, v. 44, n. 4, p. 479-488, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0765.2008.01143.x>. Acesso em: 4 jun. 2018.

NEE, L. E.; LIPPA, C. F. Alzheimer's disease in 22 twin pairs: 13-year follow-up-hormonal, infectious and traumatic factors. **Dementia and Geriatric Cognitive Disorders**, v. 10, n. 2, p. 148-151, 1999. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/Abstract/17115>. Acesso: 27 jul. 2018.

NILSSON, O. G.; SHAPIRO, M. L.; GAGE, F. H. et al. Spatial learning and memory following fimbria-fornix transection and grafting of fetal septal neurons to the hippocampus. **Experimental Brain Research**, v. 67, n. 1, p. 195-215, 1987. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00269466>. Acesso em: 15 jul. 2019.

NOBLE, J. M.; SCARMEAS, N.; PAPAPANOU, P. N. Poor oral health as a chronic, potentially modifiable dementia risk factor: review of the literature. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 384, n. 10, p. 1-8, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6526728/>. Acesso em: 27 jul. 2018.

OFFENBACHER, S.; KATZ, V.; FERTIK, G. et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. **Journal of Periodontology**, v. 67, n. 10, p. 1103-1113, 1996. Disponível em: <https://aap.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1902/jop.1996.67.10s.1103>. Acesso em: 1 ago. 2018.

O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY, J. The hippocampus as a spatial map.preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain Research**, v. 34, n. 1, p. 171-175, 1971. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006-8993\(71\)90358-1](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006-8993(71)90358-1). Acesso em: 13 jul. 2018.

OPPERMANN, R. V.; HAAS, A. N.; RÖSING, C. K. et al. Epidemiology of periodontal diseases in adults from Latin America. **Periodontol**, v. 67, p. 13-33, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/prd.12061?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 27 jul. 2018.

PAGE, R. C. The pathobiology of periodontal disease may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Annals of Periodontology*, v. 3, n. 1, p. 108-120, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9722695>. Acesso em: 8 fev. 2019.

PANIS, C.; MAZZUCO, T. L.; COSTA, C. Z. F. et al. Trypanosoma cruzi: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 58–65, 2011. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2019/5091630/>. Acesso em: 2 dez. 2019.

PALLOS, D.; CESCHIN, A.; VICTOR, G. A. et al. Menopausa: fator de risco para doença periodontal? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 28, n. 5, p. 292-297, 2006. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-72032006000500005](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032006000500005). Acesso em: 5 ago. 2018.

PAZOS, P.; LEIRA, Y.; DOMÍNGUEZ, C. et al. Asociación entre enfermedad periodontal y demência. Revisión de la bibliografía. **Neurologia**, v. 33, n. 9, p. 602-613, 2018. Disponível em: [http://www.elsevier.es/en/linksolver/ft/pii/S0213-4853\(16\)30178-5](http://www.elsevier.es/en/linksolver/ft/pii/S0213-4853(16)30178-5). Acesso em: 3 jun. 2018.

PEDROTTI, S.; NASSAR, P. O.; SAGAE, S. C. et al. Evaluation of the Influence of Experimental Periodontitis on the Sexual Behaviour of Male Wistar Rats. **British Journal of Medicine and Medical Research**, v. 15, n. 9, p. 1-8, 2016. Disponível em: <http://www.journaljammr.com/index.php/JAMMR/article/view/10549>. Acesso em: 11 set. 2018.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E. et al. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0165-0270\(85\)90031-7](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0165-0270(85)90031-7). Acesso em: 5 jul. 2018.

PELLOW, S.; FILE, S. E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 3, p. 525-529, 1986. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0091305786905526?via%3Dihub>. Acesso em: 8 jul. 2019.

PETERSEN, R. C. Mild Cognitive Impairment. **Continuum (Minneapolis, Minn)**, v. 22, n. 2, p. 404-418, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5390929/>. Acesso em: 24 jul. 2018.

PLASSMAN, B. L.; LANGA, K. M.; FISHER, G. G. et al. Prevalence of dementia in the United States: the aging, demographics, and memory study. **Neuroepidemiology**, v. 29, n. 1-2, p. 125-132, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2705925/>. Acesso em: 3 jul. 2018.

PLUM, F. Dementia: an approaching epidemic. **Nature**, v. 279, p. 372-373, 1979. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/279372a0>. Acesso em: 2 ago. 2018.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001429990301272X?via%3Dihub>. Acesso em: 20 jun. 2018.

RAMOS, A.; BERTON, O.; MORMÈDE, P. et al. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioural Brain Research**, v. 85, n. 1, p. 57-69, 1997. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432896001647>. Acesso em: 2 jun. 2019.

RENVERT, S.; PERSSON, R. E.; PERSSON, G. R. Tooth loss and periodontitis in older individuals: results from the Swedish National Study on Aging and Care. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 8, p. 1134-1144, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23088532>. Acesso em: 30 jul. 2018.

RIEDEL, G.; MICHEAU, J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 25, n. 4, p. 835-838, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11383980>. Acesso em: 4 jul. 2019.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. **Ethology and psychopharmacology**, v. 7, n. 8, p. 9-43, 1994.

Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2058-7058/7/8/10>. Acesso em: 4 jul. 2019.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. T. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, n. 2, p. 297-303, 1995. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0091-3057\(95\)00138-M](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0091-3057(95)00138-M). Acesso em: 9 jul. 2019.

SAITO, Y.; SUGAWARA, N.; YASUI-FURUKORI, N. et al. Cognitive function and number of teeth in a community-dwelling population in Japan. **Annals of General Psychiatry**, v. 12, n. 20, p. 1-6, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3706283/>. Acesso em: 25 ago. 2018.

SAPOLSKI, R. M.; UNO, H.; REBERT, C. S. et al. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. **The Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 2897-2902, 1990. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2398367>. Acesso em: 4 jul. 2019.

SCHENKEIN, H. A.; LOOS, B. G. Inflammatory Mechanisms Linking Periodontal Diseases to Cardiovascular Diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40, n.14, p. 51-69, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4554326/>. Acesso em: 25 ago. 2018.

SCOTT, H. R.; BARRETT, A. M. Dementia syndromes: evaluation and treatment. **Expert Review Neurotherapeutics**, v. 7, n. 4, p. 407-422, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2536654/>. Acesso em: 28 ago. 2018.

SELKOE, D. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 741-766, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274343>. Acesso em: 1 set. 2019.

SINHA, S. The role of beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Med Clin North Am.*, v. 86, n. 3, p. 629-639, 2002. Disponível em: [https://www.medical.theclinics.com/article/S0025-7125\(02\)00022-6/pdf](https://www.medical.theclinics.com/article/S0025-7125(02)00022-6/pdf). Acesso em: 2 fev. 2019.

SINGHRAO, S. K.; HARDING, A.; POOLE, S. et al. Porphyromonas gingivalis periodontal infection and its putative links with Alzheimer's disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1-10, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26063967>. Acesso em: 9 abr. 2018.



SHARMA, S.; RAKOCZY, S.; BROWN-BORG, H. Assessment of spatial memory in mice. **Life Sciences**, v. 87, n. 17-18, p. 521-536, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20837032>. Acesso em: 28 ago. 2019.

SHENG, M.; SABATINI, B. L.; SUDHOF, T. C. Synapses and Alzheimer's Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 5, a005777, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22491782>. Acesso em: 25 set. 2019.

SQUIRE, L. R.; WIXTED, J. T. The cognitive neuroscience of human memory since HM. **Annual Review of Neuroscience**, v. 34, p. 259-288, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3192650/>. Acesso em: 10 jul. 2019.

STEIN, P. S.; DESROSIERS, M.; DONEGAN, S. J. et al. Tooth loss, dementia and neuropathology in the Nun study. **Journal of the American Dental Association**, v. 138, n.10, p. 1314-1322, 2007. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002-8177\(14\)63215-3](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002-8177(14)63215-3). Acesso em: 26 jun. 2018.

STEWART, R.; SABBAH, W.; TSAKOS, G. et al. Oral health and cognitive function in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). **Psychosomatic Medicine**, v. 70, n. 8, p. 936-941, 2008. Disponível em: Oral health and cognitive function in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). Acesso em: 27 ago. 2018.

STRANGE, B. A.; WITTER, M. P.; LEIN, E. S. et al. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 15, p. 655-669. 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrn3785>. Acesso em: 9 jul. 2019.

SURESH, S.; MAHENDRA, J. Multifactorial Relationship of Obesity and Periodontal Disease. *Journal of Clinical and Diagnostic Research for doctors*, v. 8, n. 4, p. ZE01- ZE03, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4064865/>. Acesso em: 4 abr. 2019.

TONETTI, M. S.; VAN DYKE, T. E. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP /AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 84, n. 4, p. 24-29, 013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23631582>. Acesso em: 20 ago. 2019.

TONSEKAR, P. P.; JIANG, S. S.; YUE, G. Periodontal disease, tooth loss and dementia: Is there a link? A systematic review,

**Gerodontology**, v. 34, n. 2, p. 151-163, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ger.12261>. Acesso em: 9 jun. 2018.

TOREGEANI, J. F.; NASSAR, C. A.; TOREGANI, K. A. M. et al. Doença periodontal e aterosclerose. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 13, n. 3, p. 208-216, 2014. Disponível em: [http://www.scielo.br/pdf/jvb/v13n3/pt\\_1677-5449-jvb-13-03-0208.pdf](http://www.scielo.br/pdf/jvb/v13n3/pt_1677-5449-jvb-13-03-0208.pdf). Acesso em: 20 jul. 2018.

ULLMAN, M. T. Contributions of memory circuits to language: The declarative/procedural model. **Cognition**, v. 92, n. 1-2, p. 231-270, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010027703002324?via%3Dihub>. Acesso em: 12 jul. 2019.

VAN LIER, H.; DRINKENBURG, W. H. I. M.; COENEN, A. M. L. Strain differences in hippocampal EEG are related to strain differences in behaviour in rats. **Physiology & Behavior**, v. 78, n. 1, p. 91-97, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031938402008934?via%3Dihub>. Acesso em: 20 jul. 2018.

VETTORE, M. V.; MARQUES, R. A. A.; PERES, M. A. Desigualdades sociais e doença periodontal no estudo SBBrazil 2010: abordagem multinível. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 3, p. 29-39, 2013. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0034-89102013000900029&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0034-89102013000900029&script=sci_abstract&tlng=pt). Acesso em: 4 jul. 2018.

VEZZANI, A. et al. The role of inflammation in epilepsy. **Nature Reviews Neurology**, v. 7, n. 1, p. 31-42, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3378051/>. Acesso em: 29 jul. 2019.

VIANNA, M. R.; ALONSO, M.; VIOLA, H. et al. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. **Learning and Memory**, v. 7, n. 5, p. 333-340, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC311352/>. Acesso em: 7 jul. 2019.

VOGEL-CIERNIA, A.; WOOD, M. A. Examining object location and object recognition memory in mice. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 69, n. 8, n. 31, p. 1-17, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25297693>. Acesso em: 20 set. 2019.

XAVIER, G. F. **Técnicas para o estudo do sistema nervoso**. São Paulo: Plêiade, 1999.

WALKER, D. L.; DAVIS, M. Anxiogenic Effects of High Illumination Levels Assessed with the Acoustic Startle Response in Rats. **Biological Psychiatry**, v. 42, n. 6, p. 461-471, 1997. Disponível em: [https://www.biologicalpsychiatryjournal.com/article/S0006-3223\(96\)00441-6/pdf](https://www.biologicalpsychiatryjournal.com/article/S0006-3223(96)00441-6/pdf). Acesso em: 3 abr. 2019.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychol Bull**, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976. Disponível em: <https://drrogerwalsh.com/wp-content/uploads/2009/07/The-open-field-test.-A-critical-review.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2019.

WHIMBEY, A. E.; DENENBERG, V. H. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 63, n. 3, p. 500-504, 1967. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6064396>. Acesso em: 22 jul. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dementia**, 12 dez. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en/>. Acesso em: 4 ago. 2018.

ZHAO, Q.; TANG, X. C. Effects of huperzine A on an acetylcholinesterase isoforms in vitro: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine. **European Journal of Pharmacology**, v. 455, n. 2-3, p. 101-107, 2002. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12445575>. Acesso em: 5 set. 2019.

## ANEXO A

### Guide for Authors

#### **Your Paper Your Way**

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

*Brain, Behavior, and Immunity*, founded in 1987, is the official journal of the Psychoneuroimmunology Research Society (PNIRS). This innovative journal publishes peer-reviewed basic, experimental, and clinical studies dealing with behavioral, neural, endocrine, and immune system interactions in humans and animals. It is an international, interdisciplinary journal devoted to original research in neuroscience, immunology, integrative physiology, behavioral biology, psychiatry, psychology, and clinical medicine and is inclusive of research at the molecular, cellular, social, and whole organism level. The journal features online submission and review. Manuscripts are typically peer-reviewed and returned to authors within 30 days of submission, leading to timely publication of experimental results. There are no submission fees or page charges for *Brain, Behavior, and Immunity*, which is published eight times a year. Detailed instructions for authors can be found at <http://ees.elsevier.com/bbi/>.

Research areas include:

- Physiological mechanisms that convey messages between the immune and nervous systems and regulate their functions
- Stress and immunity, including the role of stress-related hormones and neurotransmitters on the immune system.
- Actions of cytokines, growth factors and PAMP activation on neuronal and glial cells that regulate behavior, learning, memory and neurogenesis
- Role of hormones, growth factors and cytokines in the immune and central or peripheral nervous systems
- Interactions between the immune system and brain that are involved in development of neurological, psychiatric and mental health disorders
- Role of immunological processes in neurodegenerative disorders
- The effects of psychotropic medications on immunological mechanisms and their potential relevance to therapeutic interventions

- Neuroimaging studies examining how immunological mechanisms affect brain structure and function
- Clinical trials and experimental studies testing the effects on both immune stimulation and immune suppression on brain and behavior
- The role of microglia in pain, psychological processes and in psychiatric disorders
- Immunological mechanisms involved in traumatic brain injury and its resolution
- Immunologic disorders, infection and behavior
- Role of the immune system in development and maintenance of inflammatory and chronic pain
- Immune mechanisms that regulate the blood-brain-interface (BBI)
- Immune factors that affect health psychology
- Sleep, exercise, immunity and health
- Immune system interactions that affect behavior following use of psychotropic drugs, alcohol and other drugs of abuse
- Healthy aging of the immune system and brain
- Role of inflammation and stress during perinatal development
- Cancer and its treatment, stem cells and their effects on brain behavior and immunity
- Reciprocal communication between the microbiome, immune and nervous systems
- Regulation of nerve injury and repair by the immune system
- Psychosocial, behavioral, and neuroendocrine influences on immunity and on the development and progression of immunologically-mediated diseases
- Nutrition, inflammation, obesity and behavior
- Genomics of behavior and immunity

### ***Types of Article***

Original full-length research reports, full-length review articles, short communications, brief commentaries, and letters to the editor will be considered for publication.

*Full-length research reports:* The chief criteria for the acceptance of submitted papers are the quality, originality, and clarity of the work reported, addressing one or more of the research areas reported above. There is no word limit on full length research reports, but papers should be concisely written and most should be able to articulate their findings within approximately 6,000 words.

*Reviews:* The journal publishes invited or unsolicited reviews on a contemporary topic, discussed authoritatively with the aim of providing a solid, and often novel, interpretation of research evidence, and of integrating a mechanistic model when applicable. Reviews consist of approximately 6,000 words of text and no more than 100 scientific references. Reviews must contain at least one figure highlighting the key aspects of the article, complete with explanatory figure legends. If appropriate, a color version of the figure can be published in the online publication, with a black-and-white figure in the print version. If the author chooses this option, the figure legend must be self-explanatory in the absence of color-coding.

*Short communications:* Manuscripts published as short communications are, primarily, reports of novel, solid, important findings on contemporary, fast-moving topics. Small replication studies or incomplete data that do not move the field forward, and descriptions of methods and techniques, are not appropriate for this format. Papers will be considered short communications if the text, references, and a maximum of two tables or figures (or one of each) are limited to 3,500 words. Authors may elect to include additional illustrations, but the limitation to 3,500 words will remain.

*Commentaries:* These are short pieces written to accompany the publication of impactful full-length research reports. Invited by the Editor, they are limited to 900-1000 words and 5-10 references (including a reference to the relevant published report).

*Viewpoints:* These are opinion pieces that provide a personal view on broad, contemporary topics relevant to the interaction between health, brain, behaviour and immunity. Invited by the Editor, they are limited to 900-1000 words and 5-10 references, and will generally be immediately 'open-access' at no costs to the authors.

*Letters to the editor:* These should be of high scientific quality, contain less than 500 words, and cite no more than 5 scientific references. If the letter is directed to a paper published in *Brain, Behavior, and Immunity*, the author of that paper will be provided an opportunity to respond. Both the letter to the editor and the author's response will be published simultaneously.

*Announcements:* *Brain, Behavior, and Immunity* will consider for publication announcements of interest to the readership such as notices of scientific meetings.

### ***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Poor standard of grammar or spelling will lead to the paper being sent back to Authors without peer-review. Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

### ***Study design and statistical reporting***

BBI aspires to publish papers with the highest standards of reporting and presentation of methodological details, including the study design and the statistics used.

*Study Design:* State whether: 1) samples/animals were assigned randomly to various experimental groups (and the specific method of randomization); 2) the data collected was processed randomly and appropriately blocked; 3) experimenters were blind to group assignment and outcome assignment; and 4) an appropriate sample size was computed when the study was being designed.

*Data Handling:* Clearly state the numbers of participants, animals, or samples included in the study. Provide detailed explanations of the reasons for any attrition in the study. Explain how outliers are defined and handled and any data removed before analysis must be reported. Report how often each experiment was performed and whether the results were substantiated by repetition under a range of conditions. Sufficient information about sample collection must be provided to distinguish between independent biological data points and technical replicates.

*Statistical reporting:* Authors should identify the precise statistical tests used. In addition, planned comparisons, details of controls and power analyses to determine sample sizes, if applicable, should be reported. Complete results of the statistical analyses, including p values (rather than ranges), degrees of freedom and any estimates of effects size, should be reported in full in the Results section, including all within- and between-subject factors. For multiple

comparisons and multiple correlations, define measures taken to reduce Type 1 errors. For neuroimaging studies, methods for controlling for multiple comparisons and the cluster-forming statistical threshold used must be reported. For ANOVAs, and other multivariate analyses, define measures taken to control for violation of the sphericity assumption and how you report results of corrected degrees of freedom statistics. Finally, state the name and version of the statistical software that was used.

*Addressing Sex as a Biological Variable:* We ask all authors to ensure proper consideration of sex as a biological variable. For example, any papers utilizing subjects (cells, animals, humans) of only one sex must state the sex of the samples in the title and abstract of the paper, with the obvious exception of sex-specific issues (e.g., prostate or ovarian function). Authors must also state the rationale for using samples from one sex rather than from both. For cellular work, the sex of origin of cells used should be reported, or if cells or tissue from both sexes were used without regard to sex, this fact should be indicated. Finally, the inability for any reason to study sex differences where they may exist should be discussed as a study limitation. **Format**

Manuscripts should be prepared using a 12-point font, double-spaced throughout (including tables, footnotes, references, and figure captions) with 1-in. margins on all sides. Unusual typeface is acceptable only if it is clear and legible. For initial submission, all manuscripts must be prepared and submitted in one of the following formats: Microsoft Word (.doc), WordPerfect (.wps), or Rich Text Format (.rtf). All figures and tables should be clearly labeled at the top.

Revised manuscripts should not be marked using underlined or bolded words to indicate changes from the original submission. Instead, changes in the revised manuscript must be explained in a rebuttal letter. Submission of all revised manuscripts requires both figures and tables to be submitted separately from the manuscript text: do not insert figures and tables at the end of the text for revised manuscripts. Instead, the electronic submission system requires identification and submission of figures and tables separate from the text of revised manuscripts (see information below for graphs, scans, and illustrations). For more information, please also see the Author Gateway Web page for *Brain, Behavior, and Immunity* available through the journal home page at <https://www.elsevier.com/locate/ybrbi>.

### **Contact details for submission**

Manuscripts must be written in English and submitted electronically at <http://ees.elsevier.com/bbi/>. New contributors should first register at this site and then log into the Elsevier Editorial System (EES) with their user name and password. There are eight steps that must be completed to submit a manuscript: Enter Article Title; Select Article Type; Add/Edit Remove Author (corresponding author does not need to be the person who submits the paper); Submit Abstract; Enter Key Words; Select Document Classification; Enter Comments (recommend expert reviewers); Attach Files. All sections except the last one can be 'copied and pasted' into text boxes from existing files. The files that must be attached separately are: cover letter to the Editor-in-Chief, manuscript, figures, and tables. An introductory cover letter must outline the most important research findings and their significance. Complete legends (captions) for both figures and tables should be placed at the end of the manuscript. Figures must be attached as separate files or as a single file. Tables must also be attached as either individual tables or a single file with all the tables. All files containing figures or tables must clearly identify each figure or part of figure by adding, at the

top of each figure or table, the name of the first author and abbreviated title of the manuscript. Authors can also upload supplementary material such as video, audio, movie and other files (which will be available as a link in the PDF file that the system generates). After the files are attached, the EES system will create a PDF file, which may require a few minutes. You will then be asked to approve the PDF file, a step that must be completed before the new submission is sent to the Editor-in-Chief who will initiate the review process.

### **Submission checklist**

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **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

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- 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)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

### **Ethics in publishing**

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

### **Studies in humans and animals**

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and



Publication of Scholarly Work in Medical Journals and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms sex and gender should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

### **Declaration of interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

### **Use of inclusive language**

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and

by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

### ***Authorship***

While the journal does not request details of authors contribution, in accordance with the Consensus Statement on Surgery Journals Authorship (2005) we expect that all authors meet all three of the following conditions: 1) Authors make substantial contributions to conception and design, and/or acquisition of data, and/or analysis and interpretation of data; 2) Authors participate in drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and 3) Authors give final approval of the version to be submitted and any revised version.

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum. ***Reporting clinical trials***

Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including recruitment, enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the randomization procedure. The CONSORT checklist and template flow diagram are available online.

### ***Registration of clinical trials***

Registration in a public trials registry is a condition for publication of clinical trials in this journal in accordance with International Committee of Medical Journal Editors recommendations. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. A clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

***Article transfer service***

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

**Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

***Author rights***

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

***Elsevier supports responsible sharing***

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

**Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

**Open access**

Please visit our Open Access page from the Journal Homepage for more information.

**Submit your article**

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/bbi>

***Referees***

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For

more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

### *Additional information*

#### **NEW SUBMISSIONS**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

#### *References*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

#### *Formatting requirements*

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

#### *Figures and tables embedded in text*

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

#### **REVISED SUBMISSIONS**

##### *Use of word processing software*

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). 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

### ***Subdivision - numbered sections***

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### ***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### ***Material and methods***

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

### ***Results***

Results should be clear and concise.

### ***Discussion***

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. 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. ***Appendices***

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### ***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***. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. 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. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail

address is given and that contact details are 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.
- ***Word count.*** Please include a word count, excluding references and tables.

## **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights 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).

## **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

## **Keywords**

A list of up to 10 **keywords** or phrases suitable for indexing should be provided.

## **Abbreviations**

Do not use periods after abbreviations of measure (cm, s, kg, mA, etc.) in text or tables, except for "in." (inch). The American Chemical Society *Style Guide* should be used as a reference for proper abbreviations.

## ***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.).

## ***Formatting of funding sources***

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### ***Units***

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### ***Math formulae***

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### ***Footnotes***

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

### ***Electronic artwork***

#### ***General points***

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available.

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

#### ***Formats***

Regardless of the application used, 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 the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

**Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

***Color artwork***

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

***Illustration services***

Elsevier's Author Services 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.

***Figure captions***

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

**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 and shading in table cells.

**References**

***Citation in text***

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard



reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### ***Web references***

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### ***Data references***

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### ***References in a special issue***

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### ***Reference management software***

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/brain-behavior-and-immunity>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

### ***Reference formatting***

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

### **Reference style**

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999)... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. *Cancer statistics reports for the UK*.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1.

<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

### **Journal abbreviations source**

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your

files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

### ***Data linking***

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### ***Mendeley Data***

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

### ***Data in Brief***

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

### ***Data statement***

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

### **Online proof correction**

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please

use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

### ***Additional information***

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

## ANEXO B



## Autorização

O protocolo intitulado “**Avaliação do efeito da melatonina sobre os tecidos periodontais e encéfalo de ratos adultos submetidos à periodontite experimental**”, sob a responsabilidade de **Carlos Augusto Nassar** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 17/08/2018.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2018 - 31/03/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato: Rato Wistar, <i>Rattus norvegicus</i>
N. de animais	40
Peso/Idade	250-400g/3-4 meses
Sexo	Masculino
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE - Campus Cascavel - PR.

Cascavel, 23/08/2018

**Profa. Dra. Luciana Oliveira de Farifa**  
Coordenadora do CEUA  
Portaria nº 3730/2016 - GRE