

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

IOHANA FERREIRA CHOPTIAN FIORESE

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DA PERIODONTITE E DO DIABETES
MELLITUS TIPO 1 INDUZIDOS SOBRE OS TECIDOS PERIODONTAIS E A
MUCOSA DUODENAL DE RATOS WISTAR**

CASCAVEL-PR

(maio/2020)

IOHANA FERREIRA CHOPTIAN FIORESE

**EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DA PERIODONTITE E DO DIABETES
MELLITUS TIPO 1 INDUZIDOS SOBRE OS TECIDOS PERIODONTAIS E A
MUCOSA DUODENAL DE RATOS WISTAR**

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: Biologia, processo saúde-doença e políticas de saúde.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Patrícia Oehlmeyer Nassar

CASCADEL-PR

(maio/2020)

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

Fiorese, Iohana Ferreira Choptian
Efeitos da associação da periodontite e do diabetes mellitus tipo 1 induzidos sobre os tecidos periodontais e a mucosa duodenal de ratos wistar / Iohana Ferreira Choptian Fiorese; orientador(a), Patricia Oehlmeyer Nassar , 2020.
104 f.

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

1. Inflamação. 2. Diabetes Mellitus. 3. Periodontite. I. Nassar , Patricia Oehlmeyer. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

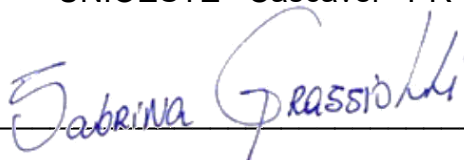
IOHANA FERREIRA CHOPTIAN FIORESE

EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DA PERIODONTITE E DO DIABETES MELLITUS TIPO 1 INDUZIDOS SOBRE OS TECIDOS PERIODONTAIS E A MUCOSA DUODENAL DE RATOS WISTAR

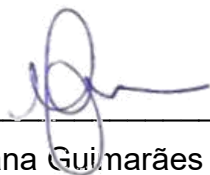
Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.



Orientador: Profa. Dra. Patricia Oehlmeyer Nassar
UNIOESTE –Cascavel - PR



Profa. Dra. Sabrina Grassioli
UNIOESTE –Cascavel - PR



Prof. Dra. Morgana Guimarães Rodrigues Stabili
UNESP - Araraquara

CASCADEL-PR

(maio/2020)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Jesus, por todo cuidado, amor e companhia em todas as vezes em que fui a Cascavel, no decorrer desses dois anos; sem Ele, nada disso seria possível.

Ao meu amor e esposo, Felipe, pelo amor, apoio, esforço e incentivo ao meu crescimento profissional.

À minha orientadora, Profa. Dra. Patrícia Oehlmeyer Nassar, sempre disposta a me atender e sanar dúvidas; pelos ensinamentos, conselhos e por contribuir para o meu desenvolvimento na pesquisa.

Aos professores, Drs. Carlos A. Nassar, Rose Meire Costa, Lucinéia Chasko e Sabrina Grassioli, pelos ensinamentos e contribuições à pesquisa.

À Jossinelma, Bianca, Ediana, Franciane Josiane e Josivane, obrigada pelo companheirismo, auxílio e contribuição no decorrer do trabalho.

Aos colegas do LABEF e LAFEM, Bruna Karla, Thainá e Pedro, por ajudarem a tornar a convivência laboratorial muito mais agradável, por dividir experiências e pelo auxílio na pesquisa e coleta.

Às técnicas de laboratório, Celeste e Sandra, obrigada por terem depositado confiança em mim e ajudado em todas as etapas do trabalho.

Aos demais professores e funcionários do programa de pós-graduação em Biociências e Saúde, pelos ensinamentos. À UNIOESTE, por ofertar esse programa. A todos vocês, muito obrigada!

RESUMO

O diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) é um fator de risco para a doença periodontal (DP), assim como a periodontite aumenta a hiperglicemia. O efeito negativo que uma exerce sobre a outra parece influenciar a existência de manifestações inflamatórias não somente locais, mas de forma sistêmica, levando a especulações de que essas doenças estão associadas a doenças intestinais inflamatórias (DII). Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da associação da DP e do DMT1 sobre aspectos histomorfométricos e radiográficos dos tecidos periodontais e da mucosa duodenal. Foram utilizados 32 ratos Wistar, subdivididos em quatro grupos experimentais. 1) Grupo Controle (GC): 10 animais; 2) Grupo doença periodontal (DP): 10 animais; 3) Grupo diabetes mellitus tipo 1 (DMT1): 8 animais 4) Grupo diabetes mellitus tipo 1 + doença periodontal (DMT1+DP): 4 animais. Nos grupos DMT1 e DMT1+DP, foi realizada a indução do DMT1, com a administração de Streptozotocina (STZ) 80mg/kg de peso corporal via intraperitoneal em dose única. Após 48hs, os animais passaram por testes de glicose e, em seguida, os grupos DP e DMT1+DP foram submetidos à indução da DP com ligadura ao redor dos primeiros molares inferiores, direito e esquerdo, de maneira que permaneceram assim até o final do experimento. Após a fase experimental (20 dias de experimento), os animais foram dessensibilizados em câmara de CO₂ e, posteriormente, decapitados em guilhotina; foram realizadas as coletas dos materiais para análises. O sangue foi coletado para avaliar as concentrações de glicose em jejum, as hemi-mandíbulas para análise histomorfométrica e radiográfica e, por fim, um fragmento duodenal foi retirado para a avaliação morfológica. Os dados obtidos apresentaram normalidade e foram analisados por meio dos testes ANOVA e pós-teste de Tukey. Os resultados da dosagem de glicose em jejum apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, sendo que o grupo DMT1 apresentou um alto nível de glicose em jejum, comparado ao grupo controle e ao DP. Contudo, o grupo DMT1+DP teve um aumento significativo em relação ao DMT1 e aos demais grupos. Nas análises radiográficas e histomorfométricas, o grupo DMT1+DP destaca-se por apresentar maior perda óssea alveolar, comparado aos demais grupos. O grupo DMT1+DP apresentou maior atividade osteoclástica em relação aos grupos controle, DMT1 e DP ($p < 0,05$). As alturas das vilosidades intestinais foram estatisticamente maiores no grupo DP, DMT1, DMT1+DP, em comparação ao controle. Em relação à altura da cripta, somente os grupos DMT1 e DMT1+DP foram significativamente maiores em comparação aos demais grupos. Sendo assim, foi possível observar que a associação do diabetes mellitus tipo I e a periodontite aumentou os efeitos deletérios sobre o tecido ósseo, com consequente efeito adverso à permeabilidade da mucosa duodenal.

Palavras-Chaves: Periodontite. Diabetes Mellitus. Duodeno. Inflamação

EFFECTS OF THE ASSOCIATION OF PERIODONTITIS AND TYPE 1 DIABETES MELLITUS INDUCED ON PERIODONTAL TISSUES AND THE DUODENAL MUCOSA OF WISTAR RATS

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is a risk factor for periodontal disease (PD), and, in turn, periodontitis increases hyperglycemia. The negative effect that one has on the other seems to influence the existence of inflammatory manifestations not only locally, but also systemically, leading to speculation that these diseases are associated with inflammatory bowel diseases (IBD). Through this, we sought to evaluate the effect of the association of periodontal disease and T1DM under histomorphometric and radiographic aspects of periodontal tissues and intestinal mucosa (duodenum). Thirty-two Wistar rats were used, subdivided into four experimental groups. 1) Control Group (CG): ten animals 2) Group of periodontal disease (PD): ten animals 3) Type 1 diabetes mellitus group (T1DM): eight animals 4) Type 1 diabetes mellitus + periodontal disease group (T1DM+PD): four animals. In groups T1DM and T1DM+PD, T1DM induction was performed with the administration of streptozotocin (STZ) 80mg/kg intraperitoneal body weight in a single dose. After 48 hours, the animals underwent glucose tests and then the DP and T1DM+DP groups were subjected to PD induction with ligation around the lower, right and left first molars and remained so until the end of the experiment. After the experimental phase (20 days of experiment), the animals were desensitized in a CO₂ chamber and later decapitated in guillotine, the material was collected for analysis. The blood was collected to evaluate fasting glucose concentrations, the hemi-mandibles for histomorphometric and radiographic analysis and finally, a duodenal fragment was removed for morphological evaluation. The data obtained were normal and were analyzed using ANOVA and Tukey's post-test. The results of the fasting glucose dosage showed statistically significant differences between the groups, and the T1DM group showed a high level of fasting glucose compared to the control group and the DP. However, the T1DM + DP group had a significant increase in relation to T1DM and the other groups. In radiographic and histomorphometric analyzes, the T1DM+DP group stands out for presenting greater alveolar bone loss, compared to the other groups. The T1DM+DP group showed greater osteoclastic activity compared to the control, T1DM and DP groups ($p < 0.05$). The heights of the intestinal villi were statistically higher in the DP, T1DM, T1DM+DP group, compared to the control. Regarding the height of the crypt, only the T1DM and T1DM+DP groups were significantly higher compared to the other groups. Thus, it was possible to observe that the association of type I diabetes mellitus and periodontitis increased the deleterious effects on bone tissue, with a consequent adverse effect on the permeability of the duodenal mucosa.

Keywords: Periodontitis. Diabetes Mellitus. Duodenum. Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema do dente e as estruturas de proteção e suporte.	17
Figura 2 – Esquema da anatomia do duodeno.	30
Figura 3 – Microscopia das vilosidades e criptas duodenais.	31
Figura 4 – Esquema de randomização dos grupos experimentais.	37
Figura 5 – Instrumentos para indução da periodontite.	39
Figura 6 – Procedimento para indução da periodontite.	39
Figura 7 – Esquema do delineamento experimental, representação da linha de tempo contendo os 20 dias de experimento.	40
Figura 8 - Radiografia representativa da hemi-mandíbula de rato mostrando a distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar (traço vermelho).	41
Figura 9 – Fotomicrografia do primeiro molar inferior, ilustrando a medida da junção cimento-esmalte (JCE) até a crista óssea alveolar (COA).	42
Figura 10 - Fotomicrografias representativas de secção sagital do primeiro molar mandíbular direito.	48
Figura 11 - Fotomicrografia representativas de secção duodenal.	50
Quadro 1 - Classificação para doenças e condições periodontais e peri-implantares.	19
Quadro 2. Classificação etiológica do DM.	23
Gráfico 1 - Valores da glicose em jejum (mg/dL) dos animais de todos os grupos estabelecidos.	45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Medidas da distância da junção cimento-esmalte até a crista alveolar em todos os grupos estabelecidos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em μm **46**
- Tabela 2** - Quantidade de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos em todos os grupos estabelecidos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em unidades. **47**
- Tabela 3** - Medidas das alturas das vilosidades (AV) e das alturas das criptas (AC) em todos os grupos estabelecidos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em μm **49**

LISTA DE ABREVIATURAS

AAP	Participantes da Academia Americana de Periodontia
AGEs	Produto Finais de Glicosilação Avançada
CEEAAP	Comitê de ética em experimentação animal e aulas práticas
DC	Doença de Crohn
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DM	Diabetes Mellitus
DMT1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Doença Periodontal
EFP	Federação Europeia de Periodontia
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HE	Hematoxilina e Eosina
HLA	Human Leukocyte Antigen
IA	Auto-Anticorpos de Ilhotas
IDF	International Diabetes Federation
IL	Interleucina
IL17	Interleucina 17
LABEF	Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional

MMP	Matriz Metaloproteinases
OMS	Organização Mundial de Saúde
RAGEs	Receptor de Produto Finais de Glicosilação Avançada
STZ	Streptozotocina
Th	Célula T Helper
Th17	Célula T Helper 17
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TNF- β	Fator de Necrose Tumoral Beta
TCA	Ácido Tricoloacético
UC	Colite Ulcerativa
UNIOESTE	Universidade Estadual do Oeste do Paraná
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
β	Beta

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
2.OBJETIVOS	16
2.1ObjetivoGeral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Doença Periodontal	17
3.2 Diabetes Mellitus	22
3.3 Relação Bidirecional Entre Diabetes Mellitus Tipo 1 e a Doença Periodontal	25
3.4 Intestino Delgado (duodeno) e a Doença Inflamatória Intestinal Associado ao Diabetes Mellitus Tipo 1 e a Doença Periodontal	29
4. METODOLOGIA	37
4.1 Caracterização do Estudo	37
4.2 Amostra	37
4.3. Perda Amostral	38
4.4. Indução Do Diabetes Mellitus Tipo 1	38
4.5. Indução Da Doença Periodontal	38
4.6. Delineamento Experimental	40
4.7. Eutanásia dos Animais e Coleta das Amostras	40
4.8. Coleta De Sangue Para Dosagem Da Concentração De Glicose	40
4.9. Análises Radiográficas	41
4.10. Análise Histológica Das Mandíbulas	41
4.11. Análise Histológica Do Duodeno	43
4.12. Aspectos Éticos	43
4.13. Análises Estatísticas	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1. Análise da Concentração de Glicose em Jejum	45

5.2. Análise radiográfica e histomorfométrica da medida da JCE à crista óssea alveolar	46
5.3. Análise histomorfométrica para quantificação de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos	46
5.4. Análise histomorfométrica do duodeno	49
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS GERAIS	54
7. ARTIGO CIENTÍFICO	65
ANEXOS	86
ANEXO 1 – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA	86
ANEXO 2 – NORMAS DA REVISTA	87

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é considerada um importante problema de saúde pública, por apresentar grande prevalência na humanidade, pois sua forma severa atinge cerca de 740 milhões de pessoas em todo o mundo (LIRA-JUNIOR; FIGUEREDO, 2016).

A periodontite é uma condição inflamatória infecciosa complexa com fatores contribuintes multifatoriais, que destroem os tecidos de suporte dentário, levando à destruição óssea alveolar e perda dentária. A compreensão das interações dinâmicas, entre os vários patógenos periodontais, e a imunossupressão inflamatória, mediada pelas respostas do hospedeiro, aumentaram significativamente, destacando a importância genética, epigenética, estilo de vida e fatores ambientais na patogênese da periodontite (PIMENTEL et al., 2019). Nesse contexto, estudos têm indicado que estados diabéticos/hiperglicêmicos aumentam o risco para o desenvolvimento e progressão da periodontite, a qual estaria relacionada à perda dentária futura, principalmente, em estado glicêmico mal controlado (RIBEIRO et al., 2011; ZIUKAITE et al., 2018).

O diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) consiste em desordens metabólicas e têm como característica o aumento do nível de glicose no sangue (hiperglicemia), decorrente da ausência do hormônio insulina. É uma doença autoimune, em que ocorre a destruição das células β pancreáticas (SHANMUKAPPA et al., 2017). Subdivide-se em DM tipo 1A e DM tipo 1B, a depender da presença ou da ausência laboratorial de autoanticorpos circulantes, respectivamente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

O diabetes é um fator de risco para periodontite, assim como a periodontite piora o controle glicêmico do diabetes (PRESHAW et al., 2012). A relação bidirecional entre essas doenças efetiva-se pela interação dos AGEs (produtos finais de glicosilação avançada) com seus receptores RAGEs (receptores de produtos finais de glicosilação avançada). Regularmente, em indivíduos saudáveis, ocorre a formação de AGEs, de forma lenta; já em indivíduos diabéticos, se formam, de modo rápido, devido à alta disponibilidade de glicose circulante (KERBAUY et al., 2008).

A formação do complexo AGEs-RAGEs está diretamente envolvida no

surgimento e severidade das complicações diabéticas. Essa ligação aumenta a resposta inflamatória do biofilme dental; isso ocorre quando as células são ativadas pelos AGEs, fazendo com que haja um aumento na produção de citocinas, tais como interleucina -17 (IL-17) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), as quais têm papel fundamental na reabsorção óssea. A IL-17 é produzida por células T helper (Th17) e está associada ao desenvolvimento inflamatório periodontal, de maneira que pode atuar na regulação da TNF- α , favorecendo a sequência de eventos inflamatórios locais e possíveis danos teciduais (COSTA et al., 2015; BECKLEN et al., 2007).

Kim et al. (2017) relatam que a expressão de TNF- α está aumentada no processo inflamatório exacerbado da DP e DMT1. A TNF- α tem sido identificada como um potente competidor dos receptores de insulina, aumentando os níveis de glicose no sangue (KERBAUY et al., 2008; BRANDÃO et al., 2011; PRESHAW et al., 2012; ALMEIDA et al., 2015).

A inflamação é o elo que relaciona a DP e o DMT1. O aumento dos AGEs-RAGEs, em indivíduos com DMT1, causa alterações da resposta imunoinflamatória pelo hospedeiro em relação à placa microbiana na DP. Dessa forma, conseqüentemente, esse aumento de AGEs, relacionado com seus receptores, no tecido gengival, é o principal mecanismo de destruição do periodonto em pacientes com DMT1 (GENNARO, 2012; KERBAUY et al., 2008).

A resposta inflamatória, que ocorre na DP e no DMT1, gera situações de inflamação sistêmica de baixo grau, levando a especulações de que essas doenças estão associadas às enfermidades inflamatórias intestinais (LIRA-JUNIOR; FIGUEREDO, 2016; SPAENDONK et al., 2017). As manifestações clínicas das doenças inflamatórias intestinais (DII) podem ocorrer em todas as partes do intestino, tal como o intestino delgado. O intestino delgado é composto por duodeno, jejuno e íleo; é nesse local que ocorre a absorção de nutrientes dos produtos da digestão. Morfologicamente, o duodeno é composto por vilosidades e as criptas de lieberkuhn, que auxiliam o processo de absorção (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

No duodeno, há presença de bactérias benéficas, chamadas de microbiota intestinal, que, em equilíbrio, desempenha importante papel nos processos imunológicos, nutricionais e patológicos (MORAES et al., 2014). Estudos com animais, nos quais foi induzida a DP, bem como em pacientes com

DMT1, houve a apresentação de alterações morfológicas, funcionais e desequilíbrio da microbiota intestinal. Em ratos com periodontite, os autores observaram que apresentavam encurtamento das vilosidades no jejuno, estratificação epitelial, degeneração da lâmina basal e infiltrado com neutrófilos no intestino delgado, comparado ao grupo controle (MESSORA et al., 2013).

Em pacientes com DMT1, Pellegrini et al. (2017) encontraram sinais de inflamação crônica e latente, bem como de impacto macroscópico no intestino delgado. Houve aumento da permeabilidade intestinal e menor diversidade microbiana na mucosa duodenal. Foi observado que esses pacientes apresentavam um aumento de firmicutes e uma diminuição de bacteroides, comparado ao grupo controle saudável. Os autores sugerem que essas alterações, que ocorrem na mucosa intestinal dos diabéticos, poderiam ser a chave da alteração na resposta imunológica no intestino.

Considerando a forte relação entre o DMT1 e a DP, bem como os poucos estudos sobre os efeitos da associação a respeito da mucosa intestinal, a hipótese deste trabalho é de que a periodontite e o diabetes mellitus, concomitantemente, podem potencializar as alterações periodontais e intestinais (duodeno) em ratos, quando comparados aos efeitos de cada doença isolada sobre esses tecidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da associação da doença periodontal e do diabetes mellitus tipo 1 sobre aspectos histomorfométricos e radiográficos dos tecidos periodontais e da mucosa intestinal (duodeno).

2.2 Objetivos Específicos

Verificar a indução do diabetes mellitus tipo 1 e os efeitos da periodontite sobre o controle glicêmico pela análise da concentração plasmática de glicose;

Verificar a indução da doença periodontal, por meio das medidas histomorfométricas (hemimandíbula direita) e radiográficas (hemimandíbula esquerda) da medida da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar dos animais;

Quantificar as células do tecido ósseo (osteócito, osteoblasto e osteoclásto) da hemimandíbula direita dos animais, com base em análise histológica;

Analisar os efeitos da associação da periodontite e do diabetes mellitus tipo I, na mucosa duodenal, quanto à medida da altura da vilosidade e da cripta dos animais, por meio de análise histológica e morfométrica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Doença Periodontal

O periodonto é uma estrutura complexa e dinâmica, composta por tecidos moles e duros, que abrange o cemento e tecidos de autorrenovação, incluindo a mucosa gengival (epitélio e conjuntivo), ligamento periodontal e osso alveolar, que, juntos, oferecem proteção e suporte para a ligação dos dentes na mandíbula e maxila (Figura 1) (GARLET et al., 2012; LINDHE et al., 2005).

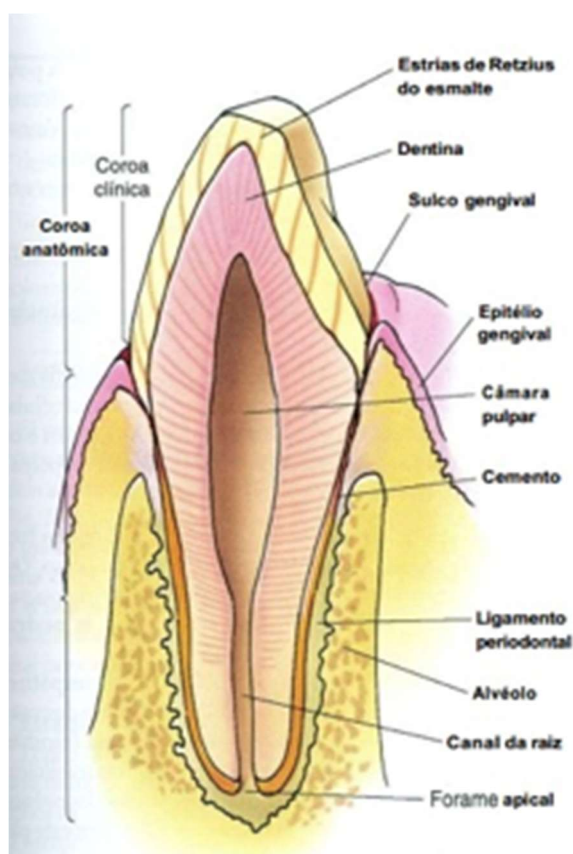


Figura 1 – Esquema do dente e as estruturas de proteção e suporte. Fonte: (GARTNER; HIATT, 1999).

As doenças periodontais têm grande prevalência na humanidade. Sua fase inicial é chamada de gengivite e se apresenta como uma condição inflamatória reversível do tecido mole circundante aos dentes, por meio de uma resposta imune direta à placa bacteriana, formada nas superfícies dentárias

(LIRA-JUNIOR; FIGUEREDO, 2016). A periodontite é uma doença inflamatória crônica multifatorial, associada com um biofilme disbiótico e caracterizada por destruição do aparato de suporte dos dentes. Suas principais características incluem a perda de suporte tecidual periodontal, manifestada por perda de inserção clínica e perda óssea alveolar, avaliada, radiograficamente, além de presença de bolsas periodontais e sangramento gengival. A periodontite é um importante problema de saúde pública, devido à sua alta prevalência, além de poder levar à perda e incapacidade dentária, afetar, negativamente, a função mastigatória e estética, ser uma fonte de desigualdade social e prejudicar a qualidade de vida (PAPAPANOU et al., 2018). Sua forma severa afeta mais de 740 milhões de pessoas em todo o mundo (LIRA-JUNIOR; FIGUEREDO, 2016).

“A saúde é um estado de completo bem-estar físico, mental e social e não apenas a ausência de doença ou enfermidade”. Baseado nessa definição da Organização Mundial da Saúde (OMS), segue-se que saúde periodontal deve ser definida como um estado livre de doença periodontal inflamatória, que permite uma função normal do indivíduo e evita consequências (mentais ou físicas), devido à doença atual ou passada. Com base nessa estrutura geral de saúde, a saúde periodontal deve basear-se na ausência de doença, conforme avaliado, clinicamente, associada com gengivite, periodontite ou outras condições periodontais, a qual pode incluir pacientes que tiveram história de gengivite ou periodontite, ou outras condições periodontais, tratadas com sucesso, que foram e são capazes de manter a dentição sem sinais de inflamação clínica gengival. Além disso, a saúde periodontal clínica envolve um controle imune e fisiológico, que abrange níveis de marcadores biológicos e inflamatórios compatíveis com a homeostase (CHAPPLE et al., 2018).

Sendo assim, um esquema de classificação para doenças e condições periodontais e peri-implantares é necessário para os clínicos, a fim de que possam diagnosticar e tratar, adequadamente, os pacientes, bem como para os cientistas, de maneira que consigam investigar etiologia, patogênese, história natural e tratamento das doenças e condições (CATON et al., 2018). Participantes da Academia Americana de Periodontia (AAP) e Federação Européia de Periodontia (EFP) encarregaram-se, portanto, de atualizar a classificação de 1999, conforme quadro 1.

Quadro 1 - Classificação para doenças e condições periodontais e peri-implantares.

<p>1. Saúde Periodontal, Condições e Doenças Gengivais, subdividido em:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1.1 – Saúde Periodontal e Saúde Gengival 1.2 – Gengivite Induzida pelo Biofilme 1.3 – Doenças Gengivais Não Induzidas pelo Biofilme
<p>2. Periodontite, subdividido em:</p> <ul style="list-style-type: none"> 2.1 – Doenças Periodontais Necrosantes 2.2 – Periodontite 2.3 – Periodontite como Manifestação de Doenças Sistêmicas
<p>3. Outras Condições que Afetam o Periodonto, subdividido em:</p> <ul style="list-style-type: none"> 3.1 – Manifestações Periodontais de Doenças ou Condições Sistêmicas (Doenças ou Condições Sistêmicas que Afetam os Tecidos Periodontais de Suporte) 3.2 – Abscessos Periodontais e Lesões Endoperiodontais 3.3 – Condições e Deformidades Mucogengivais 3.4 – Forças Oclusais Traumáticas 3.5 – Fatores Relacionados ao Dente e às Próteses
<p>Para as condições peri-implantares, estas foram divididas em:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. Saúde Peri-Implantar 2. Mucosite Peri-Implantar 3. Peri-Implantite 4. Deficiências nos Tecidos Peri-Implantares Moles e Duros

Fonte: Adaptado de STEFFENS, J.P., MARCANTONIO, R.A.C. (2018). Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares: guia Prático e Pontos-Chave. *Rev Odontol UNESP*. 47(4): 189-197.

A origem da doença periodontal consiste em uma associação multifatorial complexa e indefinida quanto à sua progressão e severidade. Estudos epidemiológicos relatam alguns fatores de risco, como sexo, idade, fumo e doenças sistêmicas, a exemplo do diabetes, que são determinantes críticos da suscetibilidade e severidade dessas doenças (BOSI et al., 2018).

O conhecimento e avaliação dos fatores de risco, relacionados às doenças crônicas, são fundamentais para tratamento e prevenção da periodontite, uma vez que esses fatores aumentam a probabilidade da ocorrência das doenças. Dessa forma, os estudos populacionais são de fundamental importância como instrumento para descrever as condições de saúde da população, na investigação dos fatores determinantes de saúde e na avaliação do impacto das ações para a situação de saúde (TETTAMANTI et al., 2017).

O ineficaz controle da placa bacteriana, por parte do paciente, pode desencadear o crescimento e proliferação de bactérias, o que origina o biofilme. Caso os hábitos higiênicos não sejam realizados de maneira ideal, as espécies bacterianas induzem a produção de endotoxinas, que causam irritação gengival, além de ativar mediadores inflamatórios. Diante disso, o sangramento espontâneo é um dos sinais clínicos de inflamação gengival (WADE, 2013).

A inflamação gengival, degeneração do ligamento periodontal e do cemento, além da perda do osso alveolar, são as principais condições associadas ao desencadeamento da doença periodontal (TARIQ et al., 2012). A periodontite severa pode induzir mobilidade dental, causada pela reabsorção óssea, o que ocasiona, inclusive, a perda de dentes envolvidos nesse processo (PIHLSTROM et al., 2005).

Considera-se que a periodontite é uma doença polimicrobiana, em que complexas interações entre patógenos específicos são mais relevantes para o desenvolvimento da doença do que as espécies individuais (TORRUNGRUANG et al., 2015). Assim, acreditava-se que alguns micro-organismos, principalmente, aqueles que formam o chamado "Complexo vermelho" (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*), estivessem envolvidos, exclusivamente, com a etiologia da doença. Contudo, os avanços da tecnologia e uma compreensão mais profunda da dinâmica dos micro-organismos têm sugerido uma comunidade microbiana mais patogênica, responsável por desencadear uma inflamação crônica persistente e destruição dos tecidos, bem como um constante desafio para o sistema imunológico. Os componentes bacterianos, tais como lipopolissacarídeos, peptidoglicanos e proteases, são capazes de ativar uma resposta inflamatória, a qual estimula receptores de reconhecimento padrão de células imunes (LIRA-JUNIOR; FIGUEREDO, 2016).

A complexa interação entre estímulos dos periodontopatógenos e a resposta inflamatória do hospedeiro resulta em desenvolvimento da periodontite. O painel gênico de um organismo tende a comandar a resposta inflamatória, podendo auxiliar a expressão de mediadores inflamatórios e a maneira de ativação desses genes, que pode ser orientada por eventos epigenéticos. Ou seja, a inflamação da periodontite tem capacidade de gerar metilações no DNA, que contribuirão para a progressão da doença (STUANI et al., 2016). Os biofilmes microbianos difundem produtos deletérios e enzimas, como hialuronidases, colagenases e proteases, que alteram a composição das matrizes extracelulares, como colágeno e membranas celulares, produzindo nutrientes para seu crescimento e invasão tecidual (GULATI et al., 2014).

A resposta inflamatória persistente, desencadeada por biofilmes patogênicos, leva à destruição dos tecidos moles e duros do periodonto, com consequente perda dentária. As citocinas são reguladores centrais da resposta imunoinflamatória, produzidas por vários tipos de células, incluindo células epiteliais, fibroblastos, células dendríticas, macrófagos e células T helper (Th), em resposta a micro-organismos. A expressão de citocinas, dentro dos tecidos, irá criar um meio local específico, que controlará as respostas imunes, celular e humoral, necessárias para conduzir comensais orais e patógenos. Uma resposta imune gengival balanceada à placa bacteriana é fundamental à manutenção do periodonto saudável sem causar danos aos tecidos (EBERSOLE et al., 2014).

Alguns marcadores têm sido localizados, em larga escala, no fluido crevicular gengival, saliva e sangue, tornando-se biomarcadores da periodontite. Interleucina-1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são aumentados no auge da doença e diminuem suas quantidades com um tratamento periodontal bem-sucedido (COSTA et al., 2015). Similarmente, a Interleucina-17 (IL-17) é produzida por células T helper (Th17) e também é associada ao desenvolvimento inflamatório periodontal (COSTA et al., 2015). A IL-17, ademais, pode atuar na regulação de IL-1 β e TNF- α , favorecendo a sequência de eventos inflamatórios locais (BECKLEN et al., 2007).

Sendo assim, a periodontite pode provocar uma resposta inflamatória sistêmica por ativação da resposta de fase aguda hepática, a qual tende a representar uma fonte distante de inflamação sistêmica de baixo grau. Por essa razão, está, significativamente, associada a várias condições sistêmicas,

incluindo infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, partos prematuros, doença inflamatória intestinal (DII) e diabetes mellitus (BRITO et al., 2013; LIRA-JUNIOR; FIGUEREDO, 2016).

3.2 Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus (DM) consiste em um distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicemia persistente, decorrente da deficiência na produção de insulina ou na sua ação, ou em ambos os mecanismos, ocasionando complicações a longo prazo. Atinge proporções epidêmicas, com estimativa de 415 milhões de portadores de DM mundialmente. A hiperglicemia persistente está associada a complicações crônicas micro e macrovasculares, aumento de morbidade, redução da qualidade de vida e elevação da taxa de mortalidade. Os fatores causais dos principais tipos de DM podem ser genéticos, biológicos e ambientais, porém, não são completamente conhecidos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

Estima-se que o diabetes e as complicações decorrentes dessa doença são a principal razão de mortalidade precoce no mundo (LLAURADO et al., 2014; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017; FERNÁNDEZ-CAO et al., 2019). Não é de hoje que o diabetes é um enorme problema de saúde pública em diversos países. A International Diabetes Federation (IDF) relata que, em 2015, 8,8% da população mundial, com 20 a 79 anos, tinha diabetes; o mais preocupante é que, se essa tendência atual persistir, o número de indivíduos com diabetes está projetado a ser superior a 642 milhões, em 2040. O maior aumento dos casos de diabetes, nas próximas décadas, será em 75%, nos países em desenvolvimento, podendo prejudicar a economia do país, devido ao alto custo com a saúde, estimado em, aproximadamente, 727 bilhões de dólares (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017; FERNÁNDEZ-CAO et al., 2019).

A classificação do DM tem sido baseada em sua etiologia (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017), conforme o Quadro 2.

Quadro 2. Classificação etiológica do DM.

DM tipo 1:	
1	- Tipo 1A: deficiência de insulina por destruição autoimune das células β comprovada por exames laboratoriais;
	- Tipo 1B: deficiência de insulina de natureza idiopática.
2	DM tipo 2: perda progressiva de secreção insulínica combinada com resistência à insulina
3	DM gestacional: hiperglicemia de graus variados diagnosticada durante a gestação, na ausência de critérios de DM prévio
4	Outros tipos de DM:
	<ul style="list-style-type: none"> - Monogênicos (MODY); - Diabetes neonatal; - Secundário a endocrinopatias; - Secundário a doenças do pâncreas exócrino; - Secundário a infecções; - Secundário a medicamentos.

DM: diabetes *mellitus*; MODY: *Maturity-Onset Diabetes of the Young*.
 Fonte: adaptado de American Diabetes Association; 2017.

O diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) está relacionado com a autoimunidade e é considerado uma doença crônica autoimune, a qual se efetiva por meio da inflamação nas ilhotas pancreáticas. Autoanticorpos, produzidos no organismo, começam a atacar as células β do pâncreas, que, por sua vez, perdem a capacidade de produzir insulina, impossibilitando que a glicose adentre as células. A hiperglicemia é a principal característica da doença (SHANMUKAPPA et al., 2017; RODRIGUEZ-CALVO; RICHARDSON; PUGLIESE, 2018).

O DMT1A é a forma mais frequente de DMT1, confirmada pela positividade de um ou mais autoanticorpos. Em diferentes populações, descreve-se forte associação com antígeno leucocitário humano (*human leukocyte antigen*, HLA) DR3 e DR4. Embora sua fisiopatologia não seja totalmente conhecida, envolve, além da predisposição genética, fatores ambientais, que desencadeiam a resposta autoimune. Entre as principais exposições ambientais, associadas ao DMT1, estão infecções virais, componentes dietéticos e certas composições da microbiota intestinal (SOCIEDADE BRASILEIRA DE

DIABETES, 2017).

Os autoanticorpos, que agredem as células β , podem aparecer desde o início da vida, mas os sintomas clínicos do diabetes mellitus tipo 1 podem levar meses ou até anos para se manifestar, visto que a destruição das células β não ocorrem uma única vez. Ao longo do tempo, são perdidas cerca de 90% dessas células nos indivíduos acometidos, o que leva ao aparecimento dos sintomas clínicos da doença (RODRIGUEZ-CALVO; RICHARDSON; PUGLIESE, 2018). Apesar de o DMT1 ser mais frequente na infância e na adolescência, o diagnóstico pode ocorrer em adultos, que tendem a desenvolver uma forma lenta e progressiva da doença, denominada *latent autoimmune diabetes in adults* (LADA) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

O estudo de Pugliese (2017) mostra que o rastreamento de autoanticorpo é capaz de reconhecer, entre familiares dos pacientes, indivíduos que possam estar em risco de desenvolver DMT1. Familiares que apresentam autoanticorpos simples têm baixo risco de manifestação da doença, comparando com aqueles que apresentam múltiplos autoanticorpos, sendo que de 40% a 80% dos parentes têm chances reais de desenvolverem DMT1, entre 5 a 10 anos, respectivamente. Cerca de 5% a 10% dos casos, diagnosticados com diabetes mellitus, são do tipo 1 (ALMEIDA et al., 2015).

Constantemente, pesquisadores têm estudado a relação das manifestações intestinais no surgimento e agravamento do DMT1. Pelo fato da DII ser caracterizada pelas manifestações extraintestinais, em órgãos como o pâncreas, é ligeiramente aceito que o duodeno e o pâncreas estão correlacionados, devido ao suprimento de sangue compartilhado e à estreita relação funcional e espacial entre eles (LIRA-JUNIOR; FIGUEREDO, 2016; PELEGRINI et al., 2017). Determinadas espécies de bactérias, presentes no duodeno humano, foram inoculadas no ducto pancreático de ratos saudáveis; o resultado desse estudo apresentou infiltrado celular, com presença exagerada de células polimorfonucleares de monócito/macrófago e neutrófilos; diante disso, a resposta hiperestimulada dessas células poderia ocasionar a destruição das células betas, propiciando surgimento das complicações diabéticas, em decorrência do aumento de glicose no sangue (KORSGREN et al., 2012).

Pacientes com DMT1, ao longo da vida, estão sujeitos a passar por uma ou mais complicações causadas pela doença. As complicações diabéticas mais

relevantes, relatadas em vários estudos, são a macroangiopatia, diretamente relacionada a acidentes cerebrais vasculares, angina de peito, gangrena, aterosclerose e infarto agudo do miocárdio. A microangiopatia é outra complicação, que pode levar o paciente a desenvolver quadros de insuficiência renal, cataratas e retinopatia diabética, neuropatia, aumento da susceptibilidade às infecções pela diminuição da quimiotaxia dos neutrófilos, cicatrização tardia (diminuição da capacidade do processo de regeneração e reparo) e a doença periodontal, como a sexta maior complicação diabética no mundo (ALMEIDA et al., 2015; BJERG et al., 2018).

3.3 Relação Bidirecional Entre Diabetes Mellitus Tipo 1 e a Doença Periodontal

A relação entre o DMT1 e a DP tem sido constantemente estudada e os mecanismos que os unem não estão totalmente estabelecidos; o que se sabe é que o DMT1 contribui para o desenvolvimento de infecções orais, por meio da modificação da atividade dos fatores inflamatórios, que ocorrem nessa doença, induzindo um estado inflamatório no periodonto, que exacerba a DP. Diabéticos, com mais tempo de diagnóstico e/ou o mau controle glicêmico, juntamente com a péssima higienização bucal, têm apresentado aumento no grau de deterioração do tecido periodontal. Por isso, pacientes com DMT1 têm prevalência maior em desenvolver a periodontite (KUŹMIUK et al., 2018).

O controle glicêmico está diretamente envolvido com o surgimento e agravamento das complicações diabéticas, tal como a DP, pois a glicose elevada aumenta a formação de AGEs, que, por sua vez, tem papel importante na patogenia dessas complicações (ALMEIDA et al., 2015; BJERG et al., 2018; KERBAUY et al., 2008). Os AGEs são, basicamente, a ligação de glicose a uma proteína e o exemplo mais comum é a hemoglobina glicada (HbA1c), utilizada para diagnóstico de DMT1. Uma vez formada essa ligação, os AGEs tornam-se irreversíveis e se mantêm ligados durante toda sua meia vida. No organismo, os AGEs interagem diretamente com o colágeno, formando colágenos estáveis, resistentes à degradação enzimática normal; sendo assim, pode gerar modificações teciduais e os colágenos não degradados acumulam-se, formando ateroma em pequenos e grandes vasos (KERBAUY et al., 2008).

A hiperglicemia aumenta a expressão de receptores de produtos finais da glicosilação avançada (RAGEs), que são receptores específicos na membrana de diferentes tipos celulares (monócitos, macrófagos, linfócitos, fibroblastos e neutrófilos). Os AGEs-RAGEs elevam a expressão dos marcadores inflamatórios, disfunção endotelial e a estimulação de alguns grupos de enzimas, que podem modificar a membrana plasmática. Formação de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio citosólico, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e citocinas pró-inflamatórias (fator de crescimento transformador- β (TGF- β)), são os mais comumente encontrados (AL-HUSSAINI; KILARKAJE, 2018; BASCONES-MARTINEZ et al., 2015).

A formação do complexo AGEs-RAGEs está diretamente envolvida nas complicações do diabetes por gerar aumento do estresse oxidativo celular, induzindo uma resposta inflamatória exagerada ao modificar a resposta de determinadas células (LLAURADO et al., 2014). Em monócitos/macrófagos e fibroblastos, os AGEs produzem aumento do estresse oxidativo, modificação no fenótipo dessas células, que, por sua vez irá induzir uma produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias exagerada, as quais geram modificações no colágeno. Diante disso, a alteração que ocorre, nesse caso, interfere na remodelação do colágeno, influenciando, negativamente, a cicatrização de feridas em pacientes com DMT1. No periodonto, além da redução da resistência do tecido periodontal lesado ao ataque do agente microbiano, o aumento de AGEs interfere no metabolismo do osso, prejudicando a formação e o reparo ósseo na doença periodontal (PRESHAW et al., 2012; KERBAUY et al., 2008; BASCONES-MARTINEZ et al., 2015).

Na DP, bactérias gram-negativas, tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*, são responsáveis pela destruição do tecido. O agravante, nesse caso, é que os neutrófilos, responsáveis por eliminar esses microrganismos, perdem sua capacidade fagocítica ao interagir com os AGEs, permitindo a proliferação dessas bactérias. A propósito, no DMT1, os neutrófilos são hipofuncionais e os monócitos/macrófagos estão hiperestimulados, por isso, pacientes com DMT1 e DP, simultaneamente, podem apresentar severa destruição do tecido periodontal, por meio do processo inflamatório exacerbado (LIRA-JUNIOR; FIGUEREDO, 2016; PRESHAW et al., 2012; KERBAUY et al., 2008; BASCONES-MARTINEZ et al., 2015). Essa

resposta exagerada está presente no fluido gengival de pacientes com DMT1 e periodontite, que apresentam altos níveis de citocinas, mediadores inflamatórios e matriz metaloproteinases (MMP), quando comparado a pessoas saudáveis. A IL-17 e TNF- α e as MMP são responsáveis pela estimulação de reabsorção óssea alveolar (KERBAUY et al., 2008; BASCONES-MARTINEZ et al., 2015).

Alguns estudos apresentam predomínio de periodontite em pacientes com DMT1. Oliveira et al. (2016) estudaram a associação do DMT1 e a DP em crianças, adolescentes e adultos de 20 cidades brasileiras, em quatro regiões (norte/nordeste, sudeste, sul e centro-oeste), entre dezembro de 2008 e dezembro de 2010. Assim, todos os pacientes incluídos no estudo foram diagnosticados com DMT1, entre 1960 a 2010. Foi avaliada uma série de complicações crônicas do DMT1, as quais são macrovasculares e microvasculares, dentre outras comorbidades. O resultado desse estudo mostrou que a prevalência de periodontite, na população diabética, foi de 4,7% maior nos pacientes com maior idade e com mais tempo de diagnóstico de DMT1. Sendo assim, os autores sugerem que a duração da doença e o mau controle glicêmico podem estar relacionados com o desenvolvimento da DP e as demais complicações diabéticas.

O estudo de Almeida et al. (2015) mostrou que 22,22% e 33,33% dos pacientes diabéticos (DMT1), com níveis glicêmicos controlados ($HbA1c < 7\%$), apresentavam gengivite e bolsas profundas, respectivamente. Porém, em pacientes diabéticos descompensados ($HbA1c \geq 7\%$), 32,0% apresentaram gengivite e 40,0% bolsas profundas. Esses resultados ocasionam a crença de que a hiperglicemia potencializa as chances do paciente com DMT1 desenvolver periodontite.

Além disso, estudos sobre a relação entre a osteopenia e DMT1, realizados em modelo experimental, mostraram perda severa do osso alveolar, acompanhada de deterioração intensa dos tecidos periodontais e dentais em ratos induzidos ao DMT1. Os animais diabéticos tiveram a presença de infiltrado crônico na área de furca, trabéculas finas e menores do osso alveolar, além de abscessos periapicais, o que não ocorreu no grupo controle (SÁNCHEZ et al., 2016).

Em outros estudos com modelos animais semelhantes, as análises de microscopia eletrônica de varredura, utilizadas para medir a distância linear entre

a crista óssea alveolar e a junção cimento-esmalte, além da análise histométrica, que mediu a área entre a crista óssea inter-radicular e a área da furca, revelaram um aumento significativo de perda óssea no grupo com DMT1 induzido, comparado com o grupo sem doença. Isso indica que os efeitos negativos do DMT1 estão associados à destruição periodontal. Dessa maneira, a perda óssea alveolar ocorre de forma tridimensional, afetando todos os lados do osso. Diante disso, essa destruição óssea acontece pela remodelação óssea intermitente, ocasionada por excesso de atividade osteoclástica ou pela diminuição da atividade osteoblástica (YUCE et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Em relação à influência da periodontite no paciente diabético, o que ocorre é que a DP não tratada gera um estado inflamatório exacerbado, que vai reduzir a sensibilidade insulínica, levando a quadros hiperglicêmicos. Os altos níveis de TNF- α , TNF- β , interleucina-6 (IL-6), proteína C-reativa e fibrinogênio resultarão em aumento dos marcadores inflamatórios, o que estimula a resistência à insulina. Por isso, o TNF- α , presente no processo inflamatório gengival exacerbado, foi identificado como principal competidor de receptor de insulina. Pacientes com DMT1 apresentam reação inflamatória exagerada; além disso, as mudanças teciduais, nesses indivíduos, estabelecem alterações à resposta do hospedeiro frente às agressões, acarretando dificuldades para a cicatrização do tecido lesado (ALMEIDA et al., 2015).

No estudo de Gomes (2006), foi avaliada a condição periodontal de animais com periodontite e DMT1 induzido. Os resultados apresentaram aumento de perda óssea alveolar e destruição severa do tecido periodontal. O autor sugere que a causa concretiza-se pela influência negativa do diabetes frente ao contínuo estímulo infeccioso à resposta inflamatória no tecido ósseo danificado.

O tratamento eficaz de ambas as doenças contribui para amenizar as suas complicações. Lopes et al. (2017) estudaram os efeitos do tratamento periodontal sobre o controle glicêmico em pacientes com DMT1. Os resultados mostraram que, após 6 meses de tratamento, o controle glicêmico desses pacientes teve uma redução significativa de 10,76% de hemoglobina glicada. Um estudo com pacientes com DMT2 apresentou a redução dos níveis de hemoglobina glicada em 19,6%, após 6 meses de tratamento da doença periodontal. Assim, esses dados confirmam que o tratamento periodontal eficaz

contribui para o controle glicêmico e, possivelmente, atenua os efeitos das complicações do diabetes (TOYAMA et al., 2014).

Somado a isso, pacientes com DMT1 não produzem insulina suficiente para manter suas funções no organismo, sendo necessário que haja a reposição desse hormônio, por meio da insulinoterapia injetável, de forma diária. A quantidade de insulina ingerida ao dia varia de acordo com a necessidade de cada paciente, sendo que, para conseguir normalizar os valores de glicose circulante, a reposição de insulina deve ser o mais semelhante possível do fisiológico. Ainda assim, a reposição do hormônio, por si só, pode não ser suficiente para causar o efeito desejado; diante disso, mudanças de hábitos alimentares e atividades físicas devem complementar o tratamento, a fim de se obter resultados mais satisfatórios (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

Como já evidenciado, a hiperglicemia ocasiona a manifestação das complicações diabéticas, a exemplo da DP, que apresentam bactérias nocivas ao hospedeiro causadoras de danos teciduais na cavidade bucal. Bactérias, normalmente, encontradas na DP, como a *P. gingivalis*, foram encontradas na mucosa intestinal de indivíduos portadores de periodontite. Hajishengallis (2015) explica que, por meio da ingestão salivar, as bactérias orais chegam com facilidade ao intestino pelo sistema gastrointestinal. Um estudo com camundongos, os quais foram submetidos à ingestão de *P. gengivais*, mostrou que uma única administração da bactéria apresentou enorme repercussão à microbiota intestinal; isso foi evidenciado por uma proporção elevada de bacteróides e uma diminuição importante de firmicutes. Esse desequilíbrio na microbiota intestinal desregula a resposta imunológica, podendo ocasionar o desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais (NAKAJIMA et al., 2015).

Diante disso, o aumento da intensidade de firmicutes, em comparação aos bacteroides, também está relacionado com distúrbios metabólicos, tal como diabetes mellitus tipo 1. A variedade e proporção de microrganismos benéficos intestinais têm importância na fisiopatogênese de determinadas doenças (MORAES et al., 2014).

3.4 Intestino Delgado (duodeno) e a Doença Inflamatória Intestinal Associado ao Diabetes Mellitus Tipo 1 e à Doença Periodontal.

O intestino delgado é formado por duodeno, jejuno e íleo. É nesse local que ocorre a absorção dos produtos da digestão, que, por sua vez, inicia-se no estômago e é finalizada no intestino delgado. O duodeno compreende as primeiras 10 polegadas do intestino delgado; suas funções são, basicamente, a finalização do processo de digestão e absorção dos produtos resultantes desse processo. A histologia macroscópica do duodeno apresenta uma estrutura em formato de "C", que contorna a cabeça do pâncreas (Figura 2). Dessa forma, o suprimento sanguíneo efetiva-se pelas artérias pancreaticoduodenais superiores e inferiores (STEVENS; LOWE, 2001).

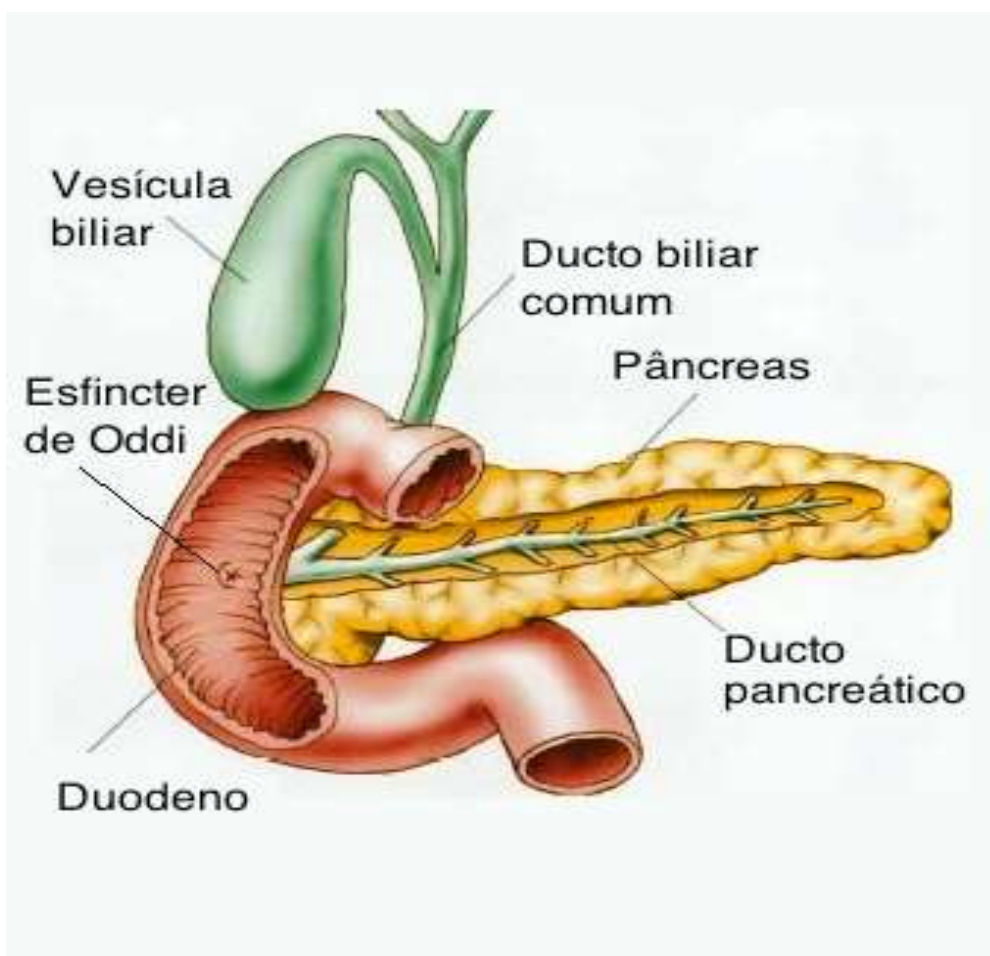


Figura 2 – Esquema da anatomia do duodeno. Adaptado de Haeblerlin e Friend, 1992.

Microscopicamente, o duodeno apresenta mucosa, submucosa e músculo, sendo que, na mucosa, encontra-se a presença de vilosidades intestinais, as quais são projeções alongadas, semelhantes a dedos de luvas, que medem cerca de 0,5 e 1 mm de altura e 0,3 mm de diâmetro. As

microvilosidades são uma espécie de pêlos microscópicos na superfície das células, que ampliam, consideravelmente, a superfície de contato para absorção nutricional. Assim, as vilosidades são revestidas por um epitélio colunar simples, composto por células caliciformes e enterócitos; diante disso, na invaginação da mucosa, entre as bases das vilosidades, encontram-se as criptas de lieberkuhn, responsáveis por secretar muco e diversas enzimas (Figura 3) (STEVENS; LOWE, 2001).

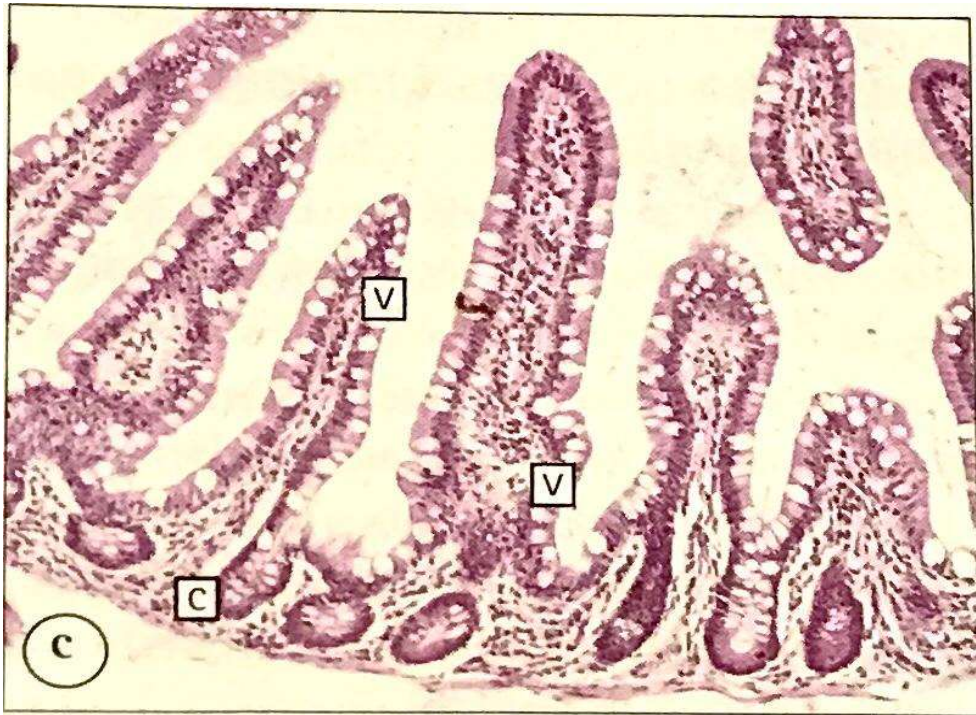


Figura 3 – Microscopia das vilosidades e criptas duodenais. (V) vilosidades projetando para a luz do intestino delgado; (C) criptas entre suas bases (STEVENS; LOWE, 2001).

O intestino delgado é composto por várias espécies de microrganismos, chamados de microbiota intestinal. Essas bactérias benéficas são capazes de sintetizar algumas vitaminas, tais como fermentação de substratos de energia não utilizados e auxiliam a regulação do sistema imune, impedindo o crescimento de microrganismos patogênicos (MARIAT et al., 2009; SPAENDONK et al., 2017; VUIK et al., 2019).

A comunidade científica tem estudado cada vez mais a microbiota intestinal, devido à sua atuação em mecanismos que beneficiam a saúde ou doença. Defeitos na barreira intestinal são aceitos como fator predisposto ao surgimento de várias doenças de caráter inflamatório, autoimune ou funcional, podendo ser locais e sistêmicas, como o DMT1 (SPAENDONK et al., 2017; VUIK

et al., 2019).

As DII ocorrem quando a microbiota em desequilíbrio desencadeia uma resposta imunológica anormal. A forma clínica da DII é identificada pela existência de manifestações extraintestinais, podendo afetar olhos, pele, articulações, pâncreas, boca, fígado e sangue (LIRA-JUNIOR; FIGUEREDO, 2016).

Sabe-se que as bactérias orais têm facilidade em chegar ao intestino; no entanto, a via contrária acontece na mesma intensidade, por isso, pacientes com doenças inflamatórias intestinais tendem a apresentar lesões orais. Assim, indivíduos com periodontite e DII, provavelmente, partilham múltiplas características etiopatogênicas e mecanismos patogênicos, sendo assim, lesões teciduais podem ocorrer em todo o trato gastrointestinal, pois a inflamação, que ocorre na DII, assemelha-se à resposta imunoinflamatória crônica na cavidade oral, podendo levar à destruição do tecido periodontal e à esfoliação dentária (MUHVIĆ-UREK; TOMAC-STOJMENović; MIJANDRUŠIĆ-SINČIĆ, 2016; PIETROPAOLI et al., 2014; OZ; CHEN; EBERSOLE, 2009). A propósito, pacientes com DII contêm níveis elevados de bactérias associadas a infecções oportunistas, em sítios subgengivais inflamados, sendo prejudicial para a interação microrganismo-hospedeiro (BRITO et al., 2012).

A patogênese da DP, similarmente à da DII, envolve uma complexa interação entre periodontopatógenos; assim, a resposta imunoinflamatória do hospedeiro é muito influenciada por fatores genéticos e ambientais. Embora a presença de microrganismos seja necessária, não é suficiente para o início da doença. É, preferencialmente, o desequilíbrio da reação inflamatória persistente do hospedeiro, diante dos patógenos, o que resulta na destruição dos tecidos periodontais (LIRA-JUNIOR; FIGUEREDO, 2016).

A variedade polimicrobiana da DP pode proporcionar inflamação crônica não somente à cavidade oral, mas a diversas partes do organismo, a exemplo do intestino. Bactérias, normalmente presentes na cavidade bucal, foram encontradas na mucosa intestinal (SILVA et al., 2017; MATTOS et al., 2014).

No estudo de Messoria et al. (2013), ratos foram induzidos à periodontite com ligadura, o que mostrou que esses animais apresentavam defeitos na vilosidade, estratificação epitelial, degeneração da lâmina basal e infiltrado com neutrófilos no intestino delgado. Outra alteração encontrada no mesmo grupo foi

o encurtamento e danos aumentados nas vilosidades do jejuno, quando comparado ao grupo controle. Isso resulta na crença de que a resposta imunoinflamatória é, potencialmente, o fator determinante a essas alterações intestinais, observadas na periodontite (LIRA-JUNIOR; FIGUEREDO, 2016).

Alguns estudos epidemiológicos têm sido realizados para investigar um possível aumento na prevalência de doença periodontal em pacientes com DII (FLEMMING et al., 1991; GRÖSSNER-SCHREIBER et al., 2006; BRITO et al., 2008; HABASHNEH et al., 2012; BRITO et al., 2013). Esses estudos têm apresentado resultados conflitantes. Grössner-Schreiber et al. (2006) mostraram que a condição periodontal, em pacientes com DII, não era significativamente diferente do grupo controle, sugerindo que a DII parece não aumentar a suscetibilidade à DP, porém, esses mesmos pacientes apresentaram maior predomínio de cáries dentárias e lesões teciduais orais, comparado com pacientes saudáveis. Por outro lado, Brito et al. (2008) encontraram significativo predomínio de periodontite em pacientes com colite ulcerativa (UC) (90%) e com doença de Crohn (DC) (81,8%), em relação aos pacientes do grupo de controle, que estavam saudáveis.

A resposta imune é o principal fator que induz aos danos teciduais observados na DII e na periodontite. Sendo assim, é razoável supor que a inflamação poderia ser o fator que conduz a um risco aumentado para periodontite, em pacientes com DII e vice-versa (MENEGAT et al., 2016). Grössner-Schreiber et al. (2006) e Menegat et al. (2016) ressaltam que as conclusões definitivas desses estudos devem ser analisadas com cautela, devido ao número limitado de amostra. Assim, seriam necessários mais estudos com quantidades maiores de pacientes para uma melhor investigação.

Semelhantemente à DP, o DMT1 apresenta uma associação forte com o intestino, interferindo na homeostase da microbiota intestinal e modificando a estruturas das microvilosidades e criptas de Lieberkuhn, o que altera a permeabilidade intestinal. Mudanças histológicas e funcionais do duodeno foram observadas em doenças pancreáticas, a saber, a pancreatite. Pacientes com DMT1 apresentam alterações na integridade da barreira intestinal, o que ocasiona o aumento da permeabilidade aparente. Com a permeabilidade debilitada, os antígenos laminais escapam do intestino, o que pode provocar respostas autoimunes, as quais, por sua vez, tendem a produzir destruição das

ilhas pancreáticas (KORSGREN et al., 2012; GÜLDEN; WONG; WEN, 2015).

Para Vaarala (2012), a evolução do ataque imune, específico das células betas pancreáticas, mediadas por imunidade adaptativa, efetiva-se pela interação da imunidade inata com os estímulos microbianos, portanto, a microbiota intestinal modificada e a falha de tolerância a bactérias comensais podem estar relacionadas com o diabetes autoimune. Dessa forma, ao considerar a imunidade intestinal, antígenos bacterianos e micro-organismos são, geralmente, detectados por ocludina insulina e claudina, que modificam seu mecanismo, além de aumentar a permeabilidade intestinal e a translocação bacteriana. Em crianças com DMT1, foi observado que alguns micro-organismos patogênicos, como o *Bacteroides sp*, influencia as junções estreitas por degradação proteolítica, devido às toxinas, elevando a permeabilidade da parede celular, inflamação local, dano celular e ausência de microvilosidade. Assim, pode ocorrer a perda de autotolerância e, conseqüentemente, respostas imunes anormais, desequilíbrio da homeostase das células T e inflamação da mucosa intestinal (MEJIA-LEO et al., 2014).

Por meio de análise do perfil da microbiota de pacientes com DMT1, foi percebida a presença abundante de macrófagos na mucosa desses indivíduos, o que provoca o aumento da resposta de citocina no processo inflamatório. Com base nesses dados, os autores revelam que há sinais de ativação imune na mucosa duodenal, em pacientes diabéticos assintomáticos e em crianças com DMT1. Nesses pacientes, a ativação imune T estava aumentada, mesmo após serem feitas análises histopatológicas, que apresentaram evidências de um intestino normal. É possível que essa abundância de infiltrado de macrófagos na mucosa duodenal possa causar prejuízos à barreira intestinal (PELLEGRINI et al., 2017).

Em um estudo experimental com animais induzidos ao DMT1, foram realizadas análises microscópicas (histológicas e morfológicas) da porção duodenal. Por meio disso, os autores observaram um aumento da altura das vilosidades e cripta, sugerindo que essa relação serve como indicador da capacidade que a mucosa intestinal tem em absorver nutrientes. Quanto maior a vilosidade, maior seria absorção de nutrientes. Outro aspecto relatado é que o organismo de pacientes diabéticos utiliza menos glicose para a sua funcionalidade e que, apesar da insuficiência insulínica, o intestino tende a elevar

a absorção nutricional (SILVA et al., 2017).

Doménech et al. (2011) observaram as alterações intestinais ocorridas em camundongos com DMT1 induzido. Os resultados mostraram que os camundongos diabéticos apresentaram remodelação intestinal, que gerou uma área aumentada de absorção de água e alimento. Ademais, os autores observaram que o intestino delgado e o cólon desses animais doentes estavam alongados em aproximadamente 10% e 20%, respectivamente. As criptas estavam mais largas e as vilosidades intestinais eram mais longas (hiperplasia da mucosa). Esses resultados sugerem que essas modificações são consideradas mudanças adaptativas da resposta à diminuição da utilização de glicose no DMT1.

Harbison et al. (2019) estudaram o microbioma e a permeabilidade intestinal de crianças saudáveis, crianças com autoimunidade de ilhotas e crianças com diabetes mellitus tipo 1. Os resultados mostraram que indivíduos com múltiplos autoanticorpos de ilhotas (≥ 2 IA) e com DMT1 apresentaram disbiose no microbioma intestinal, sendo a *Prevotella* e *Butyrivomax*, os gêneros menos abundantes. Crianças com DMT1 apresentaram maior permeabilidade intestinal comparadas a crianças saudáveis e àquelas em risco de desenvolver o DMT1 (autoanticorpos de ilhotas (≥ 2 IA)). Os autores sugerem que o desequilíbrio do microbioma intestinal influencia o surgimento e a evolução do DMT1 em crianças com risco de adoecer (≥ 2 IA) e crianças com diagnóstico inicial, respectivamente.

4. METODOLOGIA

4.1 Caracterização do Estudo

Esta pesquisa é de caráter descritivo básico, quantitativo, sendo de procedimento experimental em modelo animal (GIL, 2007). Foi realizada no Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo e no Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF), vinculados à Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Campus de Cascavel.

4.2 Amostra

Para a realização deste estudo, foram utilizados 40 ratos machos Wistar, os quais pesavam, em média, 100g, provenientes do biotério central da Unioeste. Foram mantidos no biotério setorial do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia da Unioeste, sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ$ C) e luz (ciclo claro-escuro de 12 horas). Receberam água e ração própria para roedores à vontade. Os animais foram randomizados em 4 grupos, com 10 animais cada, baseado em estudos preliminares (Nassar et al., 2009) e Teste ANOVA, com poder de 90% e nível de alfa de 5%, conforme a Figura 4.

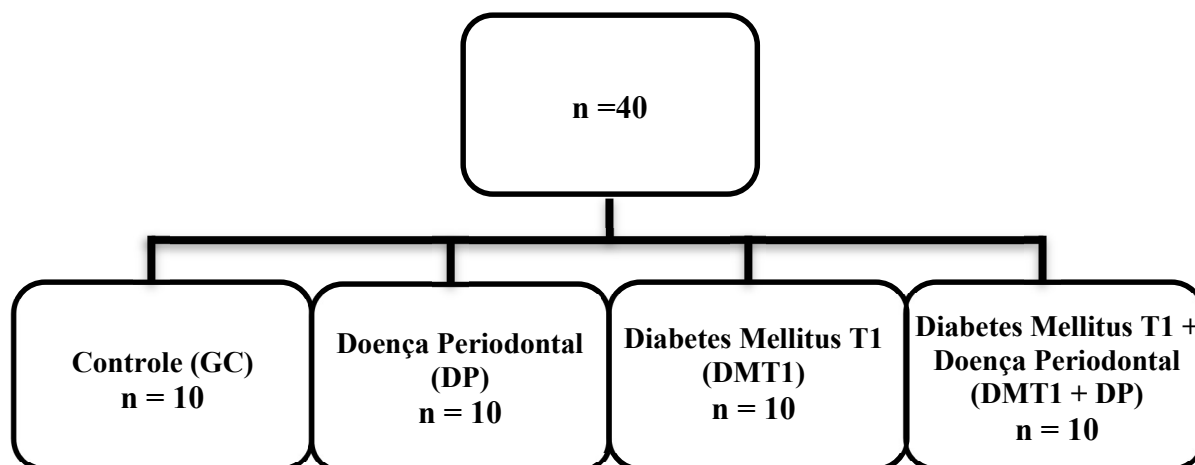


Figura 4 – Esquema de randomização dos grupos experimentais.

4.3. Perda Amostral e Cálculo da Nova Amostra

Devido ao excesso de glicose na corrente sanguínea e ao processo inflamatório exacerbado da doença periodontal, 6 animais do grupo DMT1+DP e 2 animais do grupo DMT1 não suportaram as complicações decorrentes da associação das doenças e morreram. Portanto, ao fim do experimento, os grupos ficaram divididos em: Grupo Controle (GC) n=10; Grupo Doença Periodontal (DP) n=10; Grupo Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1) n= 8 e Grupo Diabetes Mellitus Tipo 1 + Doença Periodontal (DMT1+DP) n= 4, somando 32 ratos.

4.4. Indução Do Diabetes Mellitus Tipo 1

Após 7 dias de aclimatação, para a indução do DMT1, os animais do grupo DMT1 e DMT1+DP foram submetidos à administração única de streptozotocina (STZ) 80 mg/kg de peso corporal Intraperitoneal. Para garantir a eficiência da indução do diabetes mellitus do tipo 1, foram coletadas amostras de sangue da cauda dos animais, 48 horas após a indução, para medir os níveis de glicose, com a utilização de um kit comercial (Gold Analisa®). Esses animais apresentaram concentrações de glicose entre 200mg/dL a 650mg/dL e, portanto, foram considerados diabéticos (SILVA et al., 2017). De dois em dois dias, eram feitos testes de glicose com tiras reagentes, a fim de garantir que os animais permanecessem diabéticos durante todo o experimento.

4.5. Indução Da Doença Periodontal

Após 7 dias de aclimatação e mais 2 dias de indução do DMT1 (10º dia do experimento), os animais foram anestesiados (xilazina 0,04 mg/kg e quetamina 0,08 mg/kg) e posicionados em mesa operatória adaptada (Figura 5), 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 dos primeiros molares inferiores, direito e esquerdo (NASSAR et al., 2009). Essa

ligadura atuou como irritante gengival e foi mantida por 10 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e, conseqüentemente, desenvolvimento da DP (Figura 6) (PIMENTEL et al., 2019).

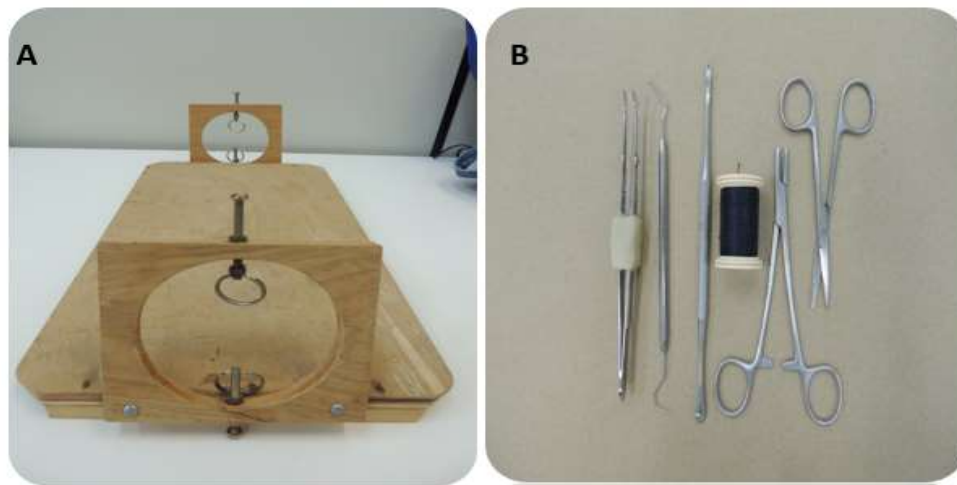


Figura 5 – Instrumentos para indução da periodontite. A: Mesa operatória apropriada com argolas fixadas B: Pinças, sonda exploratória, tesoura e fio de algodão número 40.

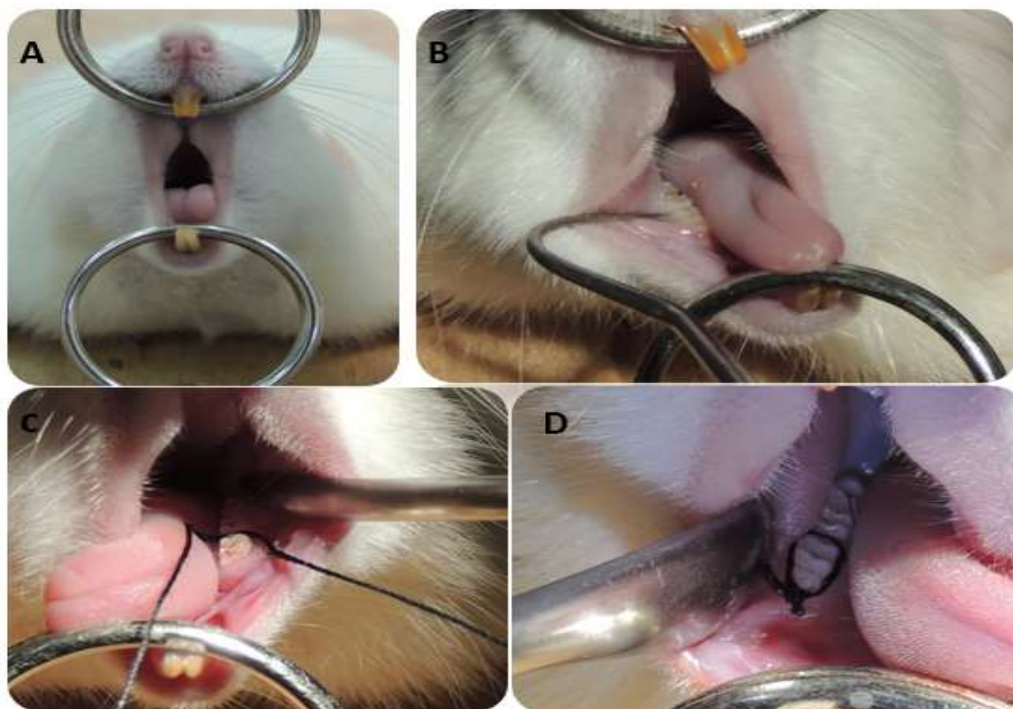


Figura 6 – Procedimento para indução da periodontite. A: Abertura da mandíbula e maxila com auxílio das alças. B: Espaçamento entre o primeiro e segundo molar com auxílio da sonda exploradora. C: introdução do fio de algodão número 40 ao redor do dente. D: Ligadura ao redor do primeiro molar inferior.

4.6. Delineamento Experimental

Os procedimentos para o desenvolvimento da pesquisa foram realizados na sequência do esquema, apresentado na Figura 7.

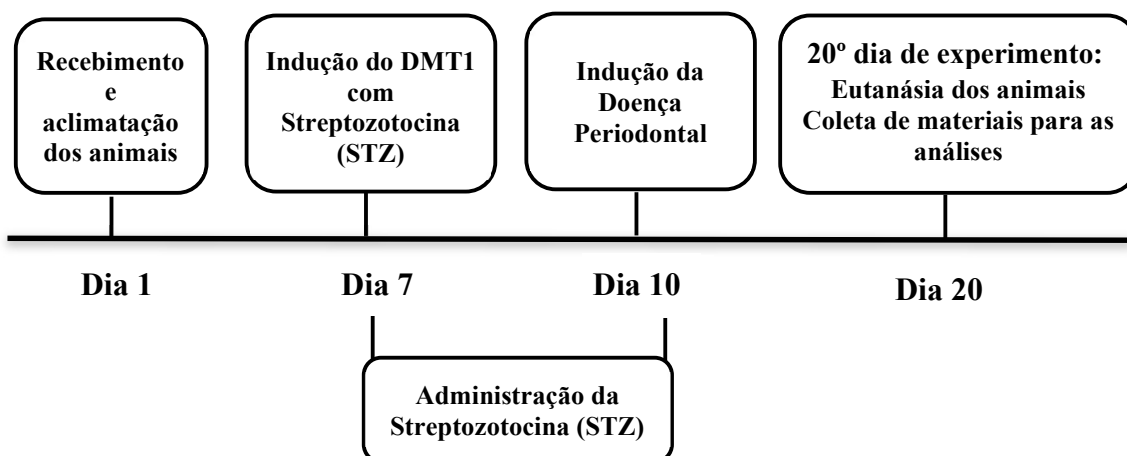


Figura 7 – Esquema do delineamento experimental, representação da linha de tempo contendo os 20 dias de experimento.

4.7. Eutanásia dos Animais e Coleta das Amostras

A eutanásia ocorreu no 20º dia do experimento. Primeiro, os animais foram dessensibilizados em uma câmara de CO₂ e depois decapitados com uma guilhotina. Hemimandíbulas foram coletadas para análise radiográfica e morfológica dos tecidos periodontais, sangue para análise de glicose e uma porção duodenal, para análise histológica.

4.8. Coleta De Sangue Para Dosagem Da Concentração De Glicose

No momento da eutanásia, o sangue foi coletado e as amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm; o plasma foi separado e estocado a -20°C, para dosagem das concentrações de Glicose, utilizando-se kit comercial (Gold Analisa ®).

4.9. Análises Radiográficas

Após a remoção do tecido gengival ao redor dos primeiros molares, foi feita a dissecação das hemimandíbulas do lado esquerdo de todos os animais. Em seguida, foram realizadas tomadas radiográficas com o uso de um aparelho de R-X da marca Dabi-Atlante, modelo Spectro com 70 Kvp e 8mA, mantendo-se uma distância foco/filme de 50 cm e tempo de exposição de 0,3 segundos. As hemimandíbulas foram colocadas com o lado lingual sobre o filme radiográfico periapical e posicionadas para que as cúspides vestibulares e linguais dos primeiros molares ficassem no mesmo plano vertical.

As imagens foram digitalizadas e analisadas. Foram efetivadas três medidas no programa Sigma-Scan 2.0, por um único examinador, em dias alternados; posteriormente, foi retirada uma média entre elas de uma medida linear, que percorrerá a distância da junção cimento-esmalte, até a crista óssea alveolar, do lado mesial, dos primeiros molares inferiores, do lado esquerdo, com as medições em centímetros (NASSAR et al., 2003), conforme figura 8.

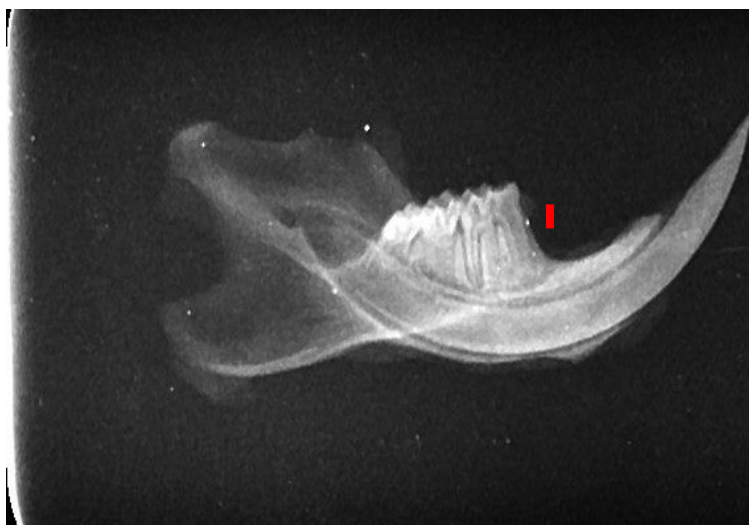


Figura 8 - Radiografia representativa da hemimandíbula de rato mostrando a distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar (traço vermelho).

4.10. Análise Histológica Das Mandíbulas

As hemimandíbulas do lado direito foram coletadas e fixadas em solução de formol a 10% por 48 horas. Após esse período, foram lavadas em água

corrente por 24 horas. As peças foram mantidas na solução descalcificadora de ácido tricloroacético (TCA) a 5%, preparado da seguinte forma: 100 mL de água destilada para 5 mL de ácido. As peças foram mantidas na solução por aproximadamente 20 dias; após, passaram por avaliação diária, a fim de se verificar o grau esperado de descalcificação, sendo realizada a troca do descalcificador TCA a cada 5 dias.

Após esse intervalo de tempo, as peças foram, novamente, lavadas em água corrente por 1 hora e foi feito o processamento histológico, em que as peças passaram pelo processo de inclusão, começando pela bateria crescente de álcool para desidratação e xilol para diafinização. A partir disso, ocorreu a inclusão das peças e obtenção de blocos de parafina (Parafina Purificada, cód. 1228, lote 1008459, Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil), os quais foram cortados em micrótomo semiautomático (Hestion®, ERM3000, Daintre e Scientific, St. Helens, Australia) e obtidos cortes de 5 µm, que foram montados em lâminas histológicas e corados pela técnica histoquímica de Hematoxilina e Eosina.

A análise microscópica foi realizada por um único examinador, com base na avaliação dos cortes histológicos corados. As lâminas foram analisadas com auxílio de um microscópio de luz, transmitida, comumente (Leica Microsystems, Switzerland), para observações morfológicas do tecido gengival, processo alveolar e contagem de osteócitos (células pequena com núcleos achatados), osteoclastos (células grandes multinucleadas) e osteoblastos (células achatadas localizadas na superfície da matriz óssea) das hemimandíbulas dos animais. Isso está evidenciado na figura 9.

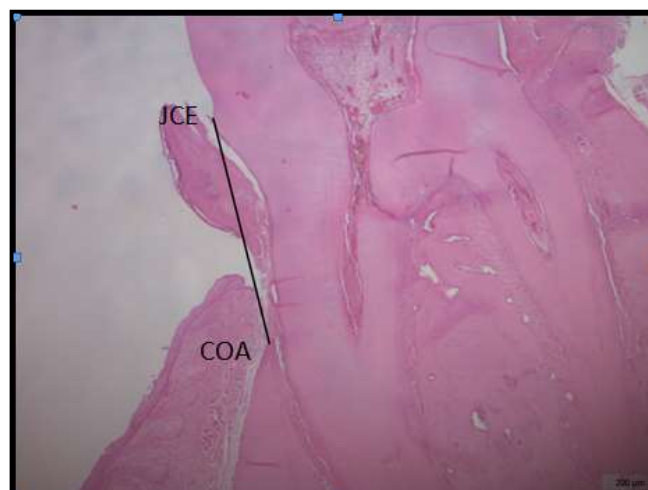


Figura 9 – Fotomicrografia do primeiro molar inferior, ilustrando a medida da junção cimento-esmalte (JCE) até a crista óssea alveolar (COA) (linha). Hematoxilina e Eosina, 4x.

4.11. Análise Histológica Do Duodeno

Uma porção do duodeno foi removida imediatamente após a eutanásia. As amostras do tecido foram abertas na borda mesentérica e fixadas em formol tamponado por 24 horas. Posteriormente, as amostras passaram pelo processo de desidratação, em séries de concentrações crescentes de álcool, e diafanização, em séries de concentrações de xilol. Após esses processos, realizou-se a inclusão das amostras em parafina, previamente aquecida em 60°C; os elementos teciduais da amostra foram infiltrados pela parafina, sendo assim, quando em temperatura ambiente, a parafina se solidifica, facilitando os cortes histológicos semisseriados, com 7 mm de espessura, os quais foram corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE). A análise morfométrica foi realizada por amostragem de imagens capturadas em objetiva de 4x no microscópio óptico Olympus, com kit para captura de imagens Axioscop 2 Plus Zeiss. A espessura foi estimada a partir da mensuração de 10 pontos aleatórios/corte, perfazendo 100 mensurações/animal, por meio do sistema de análises de imagens (Image Pró Plus[®] 4.5 – Media Cybernetics, USA), com resultados expressos em μm . Efetivou-se a medição da altura das vilosidades, com base na distância vertical entre a ponta vilosa e o nível de junção vilosidade-cripta de 10 vilosidades, em cinco campos diferentes, de cada amostra. Posteriormente, também, foi estimada a profundidade das criptas intestinais, medindo-se a distância vertical entre a junção vilosidade-cripta e o seu limite inferior de 10 criptas, em cinco campos diferentes, de cada amostra.

4.12. Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal e Aulas Práticas (CEEAAP) da UNIOESTE (Anexo I).

4.13. Análises Estatísticas

Os resultados foram analisados, usando Bioestat@ - versão 5.3 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Brasil, AM). Foi testada a distribuição normal e a variância homogênea. Como a distribuição foi considerada normal e a variância homogênea, foram utilizados os testes paramétricos ANOVA – One way, seguido por teste de comparação múltipla de Tukey. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ (5%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise da Concentração de Glicose em Jejum

De acordo com o Gráfico 1, todos os grupos analisados diferenciaram-se entre si, significativamente, em relação à glicose em jejum. O grupo que menos diferiu foi o DP, se comparado ao GC. Já o grupo DMT1, apresentou um alto nível de glicose em jejum, comparado ao grupo controle e ao DP. Contudo, o grupo que apresenta as duas doenças associadas (DMT1+DP) teve um aumento significativo em relação ao DMT1 e aos demais grupos.

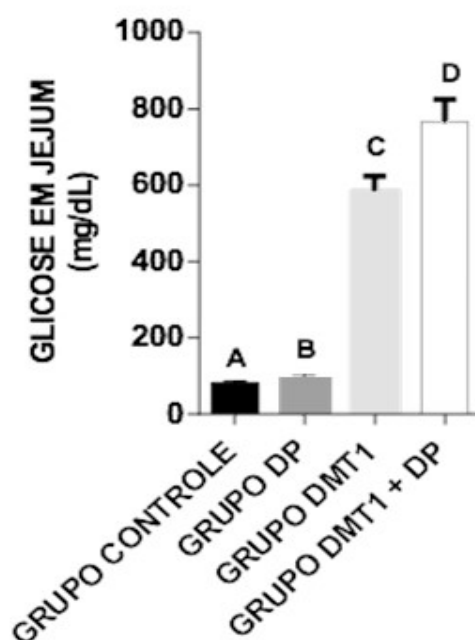


Gráfico 1 - Valores da glicose em jejum (mg/dL) dos animais de todos os grupos estabelecidos. Os valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes significam que os dados são estatisticamente diferentes, com $p < 0.05$.

5.2. Análise radiográfica e histomorfométrica da medida da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar

Por meio das avaliações radiográficas e histomorfométricas, descritas na tabela 1, constatou-se que os animais dos grupos DP, DMT1 e DMT1+DP apresentaram aumento significativo da medida da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar, comparado ao GC. Por sua vez, o grupo DP foi maior que o GC e o grupo DMT1. Contudo, quando analisamos as duas doenças associadas (DP+DMT1), o grupo se destaca, sendo o que mais obteve distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar (Figura 10).

Tabela 1. Medidas da distância da junção cimento-esmalte até a crista alveolar em todos os grupos estabelecidos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em μm .

GRUPOS	AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA		AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA	
GC	54.16 \pm 2.42	A	105.63 \pm 2.24	A
DP	122.10 \pm 5.61	C	226.52 \pm 6.60	C
DMT1	93.93 \pm 4.06	B	141.38 \pm 19.52	B
DMT1 + DP	226.84 \pm 13.40	D	440.09 \pm 6.15	D

Letras diferentes – Dados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os grupos. Teste Anov e pós-teste de Tukey.

5.3. Análise histomorfométrica para quantificação de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos

De acordo com os resultados da tabela 2, foi possível observar que os grupos DP, DMT1 e DMT1+DP obtiveram diferenças significativas na contagem de osteócitos e osteoblastos, entre si, e apresentaram menor quantidade de osteócitos e osteoblastos, comparados ao GC ($p < 0,05$). O grupo DMT1+DP apresentou maior quantidade de osteoclasto, em relação aos grupos GC, DMT1 e DP ($p < 0,05$). Ao comparar o grupo DMT1 com o GC, este não apresentou diferença estatística na quantidade de osteoclastos (Figura 10).

Tabela 2. Quantidade de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos em todos os grupos estabelecidos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em unidades.

GRUPOS	OSTEOBLASTOS		OSTEOCLASTOS		OSTEÓCITOS	
GC	455.2 \pm 6.48	A	1.1 \pm 0.32	A	462.3 \pm 3.45	A
DP	375.3 \pm 3.97	C	7.6 \pm 0.70	B	374.1 \pm 3.41	C
DMT1	428.0 \pm 2.07	B	1.6 \pm 0.74	A	418.5 \pm 0.76	B
DMT1 + DP	198.0 \pm 2.16	D	15.3 \pm 0.96	C	204.0 \pm 3.74	D

Letras diferentes – Dados estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os grupos. Teste. Anova e pós-teste de Tukey.

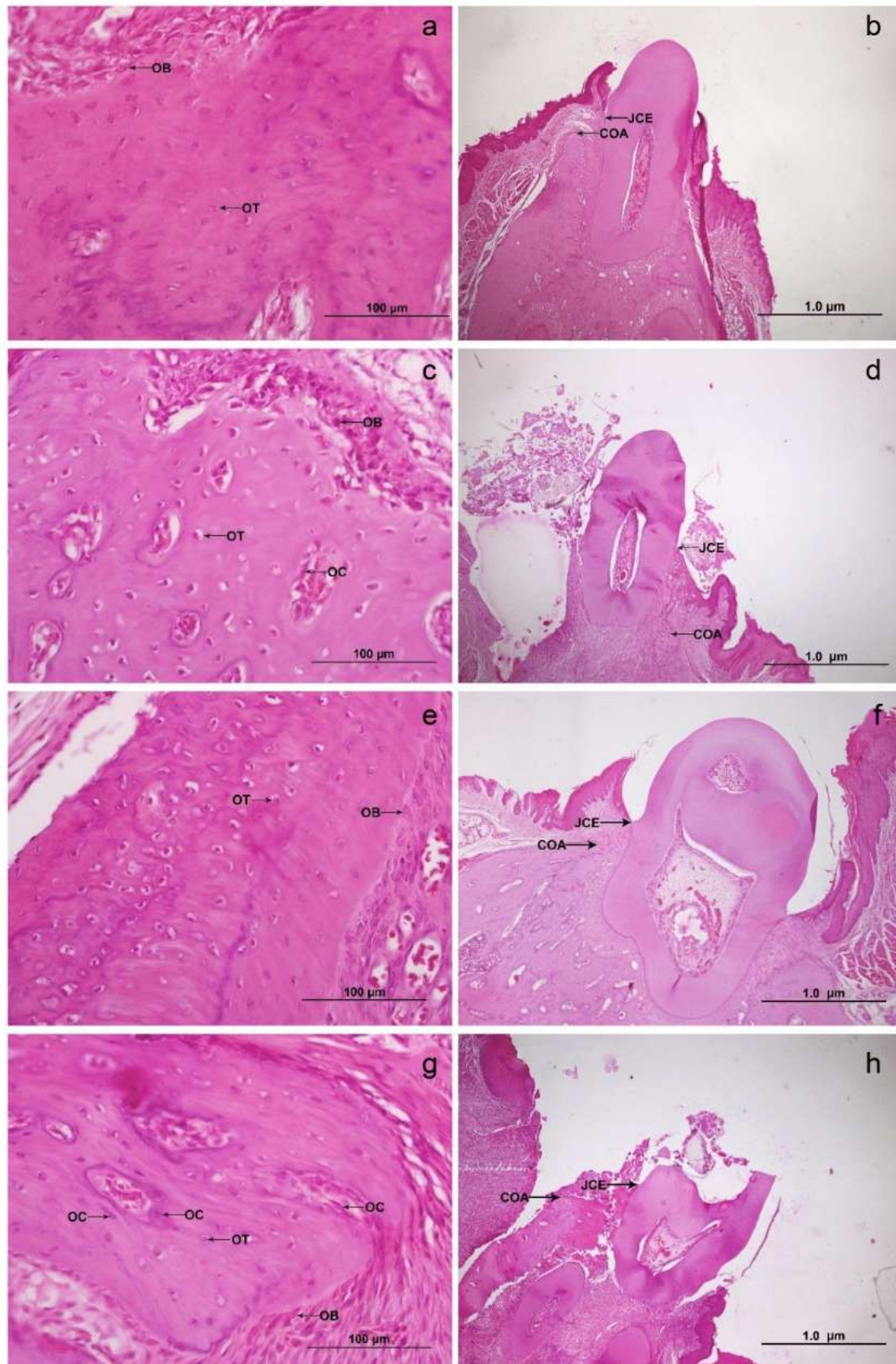


Figura 10 - Fotomicrografias representativas de uma seção sagital do primeiro molar inferior. (a) e (b) - Grupo Controle. (c) e (d) - Grupo DP. (e) e (f) - Grupo DMT1. (g) e (h) - Grupo DP+DMT1. OB: Osteoblastos; OC: osteoclastos; OT: osteócitos; JCE: junção cimento-esmalte; COA: crista óssea alveolar. Hematoxilina e Eosina (H&E); 40x, 4x.

5.4. Análise histomorfométrica do duodeno

Por meio da análise do duodeno (figura 11), constatou-se que os grupos DP, DMT1 e DMT1+DP apresentaram diferenças significantes entre si; todos diferiram estatisticamente do GC em relação à medição da altura das vilosidades. Não houve diferença estatísticas do grupo DP, comparado ao grupo controle, em relação à altura da cripta, no entanto, os grupos DMT1+DP e DMT1 apresentaram aumento da altura da cripta em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), demonstrado na tabela 3.

Tabela 3. Medidas das alturas das vilosidades (AV) e das alturas das criptas (AC) em todos os grupos estabelecidos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em μm .

GRUPOS	AV		AC	
CONTROLE	435.4 \pm 6.44	A	85.3 \pm 5.74	A
DP	447.6 \pm 10.16	B	94.1 \pm 5.34	A
DMT1	711.4 \pm 6.68	C	243.3 \pm 9.16	B
DMT1 + DP	945.9 \pm 5.03	D	340.6 \pm 10.63	C

Dados não significantes estatisticamente ($p > 0,05$) entre os grupos. Teste ANOVA um critério.

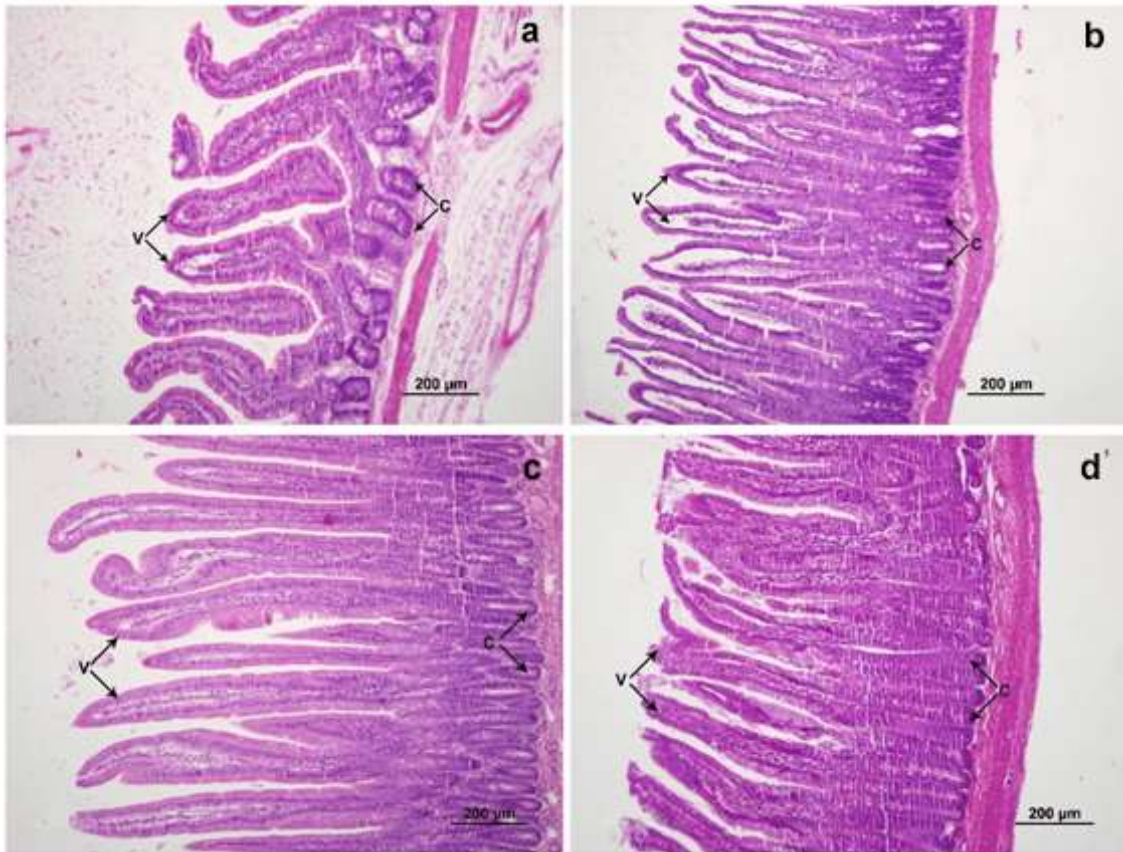


Figura 11 - Fotomicrografia representativas de secção duodenal. (a) - Grupo Controle (b) - Grupo DP. (c) - Grupo DMT1. (d) - Grupo DMT1+DP. V: vilosidades; C: criptas. Hematoxilina e Eosina (HE), 4x.

A DP, em associação a doenças inflamatórias crônicas, tem sido estudada ao longo dos anos. O modelo experimental de DP, associado ao DMT1, tem sido foco de estudos em animais com objetivo de esclarecer o efeito do diabetes sobre o periodonto; além do mais, a relação bidirecional entre essas doenças desencadeia uma série de modificações teciduais sistêmicas, em órgãos como boca e o intestino delgado (BASCONES-MARTINEZ et al., 2015; ALMEIDA et al., 2015). O presente estudo avaliou as modificações estruturais nos tecidos gengivais e na mucosa intestinal (duodeno), em modelo experimental, submetidos à periodontite e ao DMT1 induzido, utilizando métodos semelhantes de indução ao estudo de Nassar et al. (2009) e Silva et al. (2017), respectivamente, com tempo experimental reduzido em dias, de acordo com o estudo de Pimentel et al. (2019). Isso proporcionou, assim, a eficiência da DP instalada em menos dias de sofrimento para o animal, reduzindo as chances de perda amostral, embora nosso estudo tenha apresentado perda animal nos grupos DMT1 e DMT1+DP, ao longo do experimento.

O efeito negativo da inflamação persistente, que ocorre na periodontite sobre o controle glicêmico, está relacionado à manifestação de quadro hiperglicêmico severo em pacientes diabéticos (ALMEIDA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016). Semelhantemente, animais submetidos à DP e ao DMT1, concomitantemente, tendem a apresentar níveis glicêmicos elevados, como mostram os resultados desse estudo. Os animais do grupo DMT1+DP, no final do experimento, apresentavam valores de glicemia próximos a 800mg/dL, diferentemente do grupo DMT1, que se manteve na média de 600mg/dL (Gráfico 1), sendo considerado diabetes severo quando a glicemia é superior a 280mg/dL. Esses resultados levam a crer que a inflamação exacerbada da DP, bem como sua ação deletéria contribuíram para o aumento da glicemia nos animais do grupo DMT1+DP.

A hiperglicemia parece ser o combustível agravante da destruição do periodonto em diabéticos com periodontite. Alguns estudos experimentais, os quais avaliaram, radiograficamente e histometricamente, as condições periodontais em animais com DMT1 e DP, mostraram presença de inflamação periodontal seguida de severa perda óssea alveolar pelo aumento significativo de osteoclastos e diminuição de osteoblastos (YUCE et al., 2016; SILVA et al., 2017; KIM et al., 2018).

Do ponto de vista teórico, a formação óssea e a progressão de reabsorção estão em equilíbrio em condições fisiológicas normais, nas quais a reabsorção óssea é regulada pelos osteoclastos, precedendo uma nova formação óssea por osteoblastos. O que acontece na DP é um excesso de atividade osteoclástica, sucedendo uma diminuição osteoblástica, de modo que a formação de um novo tecido ósseo fica prejudicada. A presença do diabetes, por sua vez, induz a um desequilíbrio nesse processo de remodelação óssea, fazendo com que a reabsorção exceda a formação óssea (YUCE et al., 2016). Esses dados corroboram os achados do presente estudo (Tabela 1), que apresentaram maior perda óssea alveolar e destruição severa do tecido periodontal, mostrado pela distância entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar, no grupo DMT1+DP, quando comparado ao GC e o grupo DP ($p < 0,05$), tanto radiograficamente quanto histometricamente. Na contagem de células, os resultados apresentados também corroboram a literatura, em que o grupo DMT1+DP apresentou aumento exacerbado de osteoclasto e uma

diminuição significativa de osteoblastos, comparado ao grupo DP (Tabela 2). A influência negativa do DMT1, frente ao contínuo estímulo infeccioso e à resposta inflamatória, no tecido ósseo danificado, pode ser a causa da severa destruição periodontal apresentada.

Embora a relação clínica entre a DP e o DMT1 esteja bem estabelecida, poucos são os estudos que avaliaram a morfologia intestinal em ratos submetidos a essas doenças simultaneamente. Evidências sugerem que os efeitos causados por elas não se limitam a um só local no organismo, mas podem apresentar consequências sistêmicas (SILVA et al., 2017; MATTOS et al., 2014). De acordo com Ho et al. (2019) e Lira-Junior e Figueredo (2016), pacientes diabéticos e com periodontite tendem a apresentar desequilíbrio no microbioma intestinal, acarretando modificações estruturais nas vilosidades e criptas intestinais, o que altera a permeabilidade. Nesse estudo, as análises histomorfométricas mostraram que os animais diabéticos apresentaram um aumento significativo na altura da vilosidade e cripta, diferentemente dos animais não diabéticos. Esses achados estão de acordo com o estudo de Silva et al. (2017), indicando aumento na capacidade que a mucosa intestinal tem de absorver nutrientes, tais como carboidratos simples, que são responsáveis por promover picos glicêmicos. Semelhantemente, a periodontite parece interferir na morfologia intestinal; além do mais, o aumento na altura da vilosidade intestinal, nos animais com periodontite, pode estar relacionado à absorção de nutrientes, aumentando a permeabilidade aparente (Tabela 3). Esses achados são divergentes ao estudo de Messoria et al. (2013), de modo que seus resultados apresentam encurtamento das vilosidades. Tal estudo ressalta que as devidas alterações estão associadas com a presença de toxinas e a quantidade elevada de bactérias no trato gastrointestinal.

Por outro lado, as alterações intestinais (duodeno), encontradas nesse estudo (Tabela 3), fundamentam-se nos achados do grupo DMT1+DP. Os animais diabéticos e com periodontite apresentaram uma grande modificação estrutural em relação ao aumento na altura, tanto da vilosidade quanto da cripta, se comparados aos demais grupos. Os efeitos da hiperglicemia, juntamente com os efeitos sistêmicos da periodontite, parecem exercer forte influência negativa para a permeabilidade da mucosa duodenal, alterando a barreira intestinal, que

pode estar relacionada a condições metabólicas e respostas imunes exacerbadas (SILVA et al., 2017).

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A associação da periodontite induzida por ligadura e do diabetes mellitus tipo 1 aumentou os efeitos deletérios sobre o tecido ósseo com intensa perda óssea da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar e maior reabsorção óssea observada no aumento de osteoclastos e diminuição de osteócitos e osteoblastos. Assim, também, ocorreu na mucosa intestinal com exacerbção dos efeitos sobre a altura das vilosidades e das criptas do duodeno, com consequente efeito negativo sobre a permeabilidade da mucosa duodenal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-HUSSAINI, H.; KILARKAJE, N. Trans-resveratrol mitigates type 1 diabetes-induced oxidative DNA damage and accumulation of advanced glycation end products in glomeruli and tubules of rat kidneys. **Toxicol Appl Pharmacol**, Kuwait, v.15, n. 339, p. 97-109, dez., 2018.

ALMEIDA, B. B.; FERREIRA, A. C. R.; QUEIROZ, A. P. G.; DORNELAS, G. N.; COELHO, M. M. S. T. Condições periodontais em portadores de diabetes mellitus atendidos no centro de referência sul fluminense de diabetes e hipertensão de vassouras-rj periodontal conditions in patients with diabetes mellitus attended in South Fluminense reference center for diabetes and hypertension of Vassouras-RJ. **Braz J Periodontol**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 4, p.14-26, dez., 2015.

BASCONES-MARTÍNEZ, A.; MUÑOZ-CORCUERA, M.; BASCONES-LLUNDAIN. J. Diabetes y periodontitis: una relación bidireccional. **Med Clin (Barc)**, Madri, v. 145, n.1, p. 31-35, set., 2015.

BRANCO, R. C.; OLIVEIRA, J. C.; GRASSIOLLI, S.; MIRANDA. R. A.; BARELLA, L. F.; GOMES, R. M.; BATAGLINI, L. A.; TORREZAN, R.; GRAVENA, C.; MATHIAS, P. C. F. Maternal Protein Malnutrition Does Not Impair Insulin Secretion from Pancreatic Islets of Offspring after Transplantation into Diabetic Rats. **PLoS ONE**, Maringá, v. 7, n. 2, p. 1-7, fev., 2012.

BRANDÃO, D. F. L. M. O.; SILVA, A. P. G.; PENTEADO, L. A. M.; Relação bidireccional entre a doença periodontal e o diabetes mellitus. **Odontol. Clín. - Cient**, Recife, v.10, n. 2, p.117-120, abr-jun., 2011.

BECKLEN, A.; AINOLA, M.; HUKKANEN, M.; GURGAN, C.; SORSA. T.; KONTTINEN, Y. T. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. **J. Dent. Res**, Washington, v. 86, n. 4, p. 347-351, Finland, 2007.

BJERG, L.; HULMAN, A.; CARSTENSEN, B.; CHARLES, M.; JØRGENSEN, M. E.; WITTE, D. R. Development of Microvascular Complications and Effect of Concurrent Risk Factors in Type 1 Diabetes: A Multistate Model From an Observational Clinical Cohort Study. **Diabetes Care**, Denmark, v. 41, n. 11, p. 2297- 2305, ago., 2018.

BOSI, S. V.; FERON, L.; MARCON, J.; BUTZE, J.P. Perfil dos pacientes atendidos na clínica de periodontia do Centro Universitário da Serra Gaúcha (FSG). **Arch Health Investi**, Caixias do Sul, v. 7, n. 6, p. 233-236, maio, 2018.

BRITO, F.; BARROS, F. C.; ZALTMAN, C.; CARVALHO, A. T.; CARNEIRO, A. J.; FISCHER, R. G.; GUSTAFSSON, A.; FIGUEREDO, C. M. S. Prevalence of periodontitis and DMFT index in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis (2008). **J Clin Periodontol**, Rio de Janeiro v. 35, n. 6, p. 555-60, abril, 2008.

BRITO, F.; ZALTMAN, C.; CARVALHO, A. T. P.; FISCHER, R. G.; PERSSON, R.; GUSTAFSSON, A.; FIGUEREDO, C. M. S. Subgingival microflora in inflammatory bowel disease patients with untreated periodontitis. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 239-245, set., 2012.

BRITO, F.; ZALTMAN, C.; CARVALHO, A. T.; FISCHER, R. G.; PERSSON, R.; GUSTAFSSON, A.; FIGUEREDO, C. M. Subgingival microflora in inflammatory bowel disease patients with untreated periodontitis. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, London, v. 25, n. 2, p. 239-245, fev., 2013.

CATON, J. G.; ARMITAGE, G.; BERGLUNDH, T.; CHAPPLE, I. L. C.; JEPSEN, S.; KORNMAN, S. K.; MEALEY, L. B.; PAPAPANOU, P. N.; SANZ, M.; TONETTI, S. M. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. **J clin periodontol**, Copenhagen, v. 45, n. 20, p. 1-8, jun., 2018.

CHAPPLE, I. L. C.; MEALEY, B. L.; VAN DYKE, T. E.; BARTOLD, P. M.; DOMMISCH, H.; EICKHOLZ, P.; GEISINGER, M. L.; GENCO, R. J.; GLOGAUER, M.; GOLDSTEIN, M.; GRIFFIN, T. J.; HOLMSTRUP, P.; JOHNSON, G. K.; KAPILA, Y.; LANG, N. P.; MEYLE, J.; MURAKAMI, S.; PLEMONS, J.; ROMITO, G. A.; SHAPIRA, L.; TATAKIS, D. N.; TEUGHEL, W.; TROMBELLI, L.; WALTER, C.; WIMMER, G.; XENOUDI, P.; YOSHIE, H. Periodontal health and gingival diseases and conditions on a intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **J clin periodontol**, Copenhagen, v. 45, n. 20, p. 68-77, jun., 2018.

COSTA, T. A.; SILVA, M. J. B.; ALVES, P. M.; CHICA, J. E. Z. B.; BARCELOS, E. Z.; GIANI, M. A. A.; GARLET, G. P.; SILVA, J. S.; RODRIGUES JÚNIOR, V.; RODRIGUES, D. B. R.; CARDOSO, C. R. B. Inflammation biomarkers of advanced disease in nongingival tissues of chronic periodontitis patients. **Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation**, Uberaba, v. 2015, n. 983782, p.1-10, maio, 2015.

DOMÈNECH, A.; PASQUINELLI, G.; DE GIORGIO, R.; GORI, A.; BOSCH, F.; PUMAROLA, M.; JIMÉNEZ, M. Morphofunctional changes underlying intestinal dysmotility in diabetic RIP-I/hIFN β transgenic mice. **Int J Exp Pathol**, Barcelona, v. 92, n. 6, p. 400-412, dez., 2011.

EBERSOLE, J. L.; KIRAKODU, S.; NOVAK, M. J.; STROMBERG, A. J.; SHEN, S.; ORRACA, L.; GONZALEZ-MARTINEZ, J.; BURGOS, A.; GONZALEZ, O. A. Cytokine gene expression profiles during initiation, progression and resolution

of periodontitis. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v.41, n. 9, p. 853-861, set., 2014.

FERNÁNDEZ-CAO, J. C.; WARTHON-MEDINA, M.; MORAN, H. V.; ARIJA, V.; DOEPKING, C.; SERRA-MAJEM, L.; LOWE, N. M. Zinc Intake and Status and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutrients**, Chile, v.11, n.5, p.1027, mai., 2019.

FIGUEREDO, C. M.; BRITO, F.; BARROS, F. C.; MENEGAT, J. S.; PEDREIRA, R. R.; FISCHER, R. G.; GUSTAFSSON, A. Expression of cytokines in the gingival crevicular fluid and serum from patients with inflammatory bowel disease and untreated chronic periodontitis. **J Periodontal Res**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 1, p. 141-146, fev., 2011.

FLEMMIG, T. F.; SHANAHAN, F.; MIYASAKI, K. T. Prevalence and severity of periodontal disease in patients with inflammatory bowel disease (1991). **J Clin Periodontol**, California, v.18, n. 9, p. 690-697, out., 1991.

GARLET, G. P. Inflammation, Chronic Diseases and Cancer - Cell and Molecular Biology, Immunology and Clinical Basis. **Rijeka: In Tech, local, v., n.**, p. 219-264, mar., 2012.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

GENNARO, G. **Análises de presença de citocinas no periodonto de ratos diabéticos tratados com chá verde**. Gerson Francisco de Assis, 2012. 144p. Tese (doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, Bauru, São Paulo, 2012.

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

GOMES, D. A. S. **Influência do estado diabético na doença periodontal induzida em ratos. Análise bioquímica, macroscópica, radiográfica e dos níveis de mieloperoxidase**. Denise Madalena Palomari Spolidório 2006. 94f. Dissertação (mestrado em Odontologia – Área de PERIODONTIA) - Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araraquara, São Paulo, 2006.

GROOP, P. H.; FORSBLOM, C.; THOMAS, M. C. Mechanism of disease: Pathwayselective insulin resistance and microvascular complications of diabetes. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**, Finlândia, v. 1, n. 2, p. 100-110, dez., 2005.

GRÖSSNER-SCHREIBER, B.; FETTER, T.; HEDDERICH, J.; KOCHER, T.; SCHREIBER, S.; JEPSEN, S. Prevalence of dental caries and periodontal disease in patients with inflammatory bowel disease: a case–control study. **J Clin Periodontol**, Germany, v. 33, n. 7, p. 478-484, jul., 2006.

GULATI, M.; ANAND, V.; GOVILA, V.; NIKIL, J. Host modulation therapy: an indispensable part of perioceutics. **J Indian Soc Periodontol**, Mumbai, v. 18, n.3, p. 282-288, mai./jun., 2014.

GÜLDEN, E.; WONG, F. S.; WEN, L. The Gut Microbiota and Type 1 Diabetes. **Clin Immunol**, Usa, v. 159, n. 2, p. 143-153, ago., 2015.

HABASHNEH, R. A.; KHADER, Y. S.; ALHUMOZ, M. K.; JADALLAH, K.; AJLOUN, Y. The association between inflammatory bowel disease and periodontitis among Jordanians: a case–control study. **J Periodont Res**, Jordan, v. 47, n. 3, p. 293-298, jun., 2012.

HAIJSHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nat Rev Immunol**, Philadelphia, v. 15, n. 1, p. 30-44, jan., 2015.

HARBISON, J. E.; ROTH-SCHULZE, A. J.; GILES, L. C.; TRAN, C. D.; NGUI, K. M.; PENNO, M. A.; THOMSON, R. L.; WENTWORTH, J. M.; COLMAN, P. G.; CRAIG, M. E.; MORAHAN, G.; PAPENFUSS, A. T.; BARRY, S.C.; HARRISON, L. C.; COUPER. J.J. Gut microbiome dysbiosis and increased intestinal permeability in children with islet autoimmunity and type 1 diabetes: A prospective cohort study. **Pediatric Diabetes**, Australia, v. 20, n. 5 p.574-583, ago., 2019.

HO, J.; NICOLUCCI, A. C.; VIRTANEN, H.; SCHICK, A.; MEDDINGS, J.; REIMER, R. A.; HUANG, C. Effect of probiotic on microbiota, intestinal permeability and glycemic control in children with type 1 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, Canada, v.104, n. 6, p. 4427-4440, jun., 2019.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. **Histologia básica: texto e atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KERBAUY, W. D.; LIMA, F. R.; PERRELLA, F. A.; AMORIM, J. B. O. Produtos finais de glicosilação avançada (age) e a exacerbação da doença periodontal em diabéticos – revisão de literatura advanced glycation end products (age) and the exacerbation of periodontal disease in diabetics patients – review. **R. Periodontia**, São José dos Campos, v. 18, n. 3, p. 20-27, set., 2008.

KIM, J-H.; KIM, A. R.; CHOI, Y. H.; JANG, S.; WOO, G-H.; CHA, J-H.; BAK. E-J.; YOO, Y-J. Tumor necrosis factor- α antagonist diminishes osteocytic RANKL and sclerostin expression in diabetes rats with periodontitis. **PLoS ONE**, China, v. 12, n. 12, p.1-13, dez., 2017.

KORSGREN, S.; MOLIN, Y.; SALMELA, K.; LUNDGREN, T.; MELHUS, A.; KORSGREN, O. On the etiology of type 1 diabetes: a new animal model signifying a decisive role for bacteria eliciting an adverse innate immunity response. **Am J Pathol**, Sweden, v. 181, n. 5, p. 1735-1748, nov., 2012.

KOSTIC, A. D.; GEVERS, D.; SILJANDER, H.; VATANEN, T.; HYÖTYLÄINEN, T.; HÄMÄLÄINEN, A.; PEET, A.; TILLMANN, V.; PÖHÖ, P.; MATTILA, I.; LÄHDESMÄKI, H.; FRANZOSA, E. A.; VAARALA, O.; GOFFAU, M.; HARMSSEN, H.; ILONEN, J.; VIRTANEN, S. M.; CLISH, C. B.; OREŠIČ, M.; HUTTENHOWER, C. H. KNIP, M.; XAVIER, R. J. The Dynamics of the Human Infant Gut Microbiome in Development and in Progression towards Type 1 Diabetes. **Cell Host Microbe**, Boston, v. 17, n. 2, p. 260-273, fev., 2015.

KUŹMIUK, A.; MARCZUK-KOLADA, G.; ŁUCZAJ-CEPOWICZ, E.; OBIDZŃSKA, M.; CHORZEWSKA, E.; WASILCZUK, U.; KIERKLO, A.; SZAJDA, S. D. Znaczenie opieki stomatologicznej w utrzymaniu zdrowia jamy ustnej u dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1. Importance of dental care to maintain oral health of children and youth with type 1 diabetes. **Medycyna Pracy**, Polônia, v. 69, n. 1, p. 37-44, jan., 2018.

LIRA-JUNIOR, R.; FIGUEREDO, C. M.; Periodontal and inflammatory bowel diseases: Is there evidence of complex pathogenic interactions? **World J Gastroenterol**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 35, p. 7963- 7972, ago., 2016.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. Tratado de periodontologia clínica e Implantologia oral. 4 ed. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, p. 1013, 2005.

LLAURADO, G.; CEPERUELO-MALLAFRE, V.; VILARDELL, C.; SIMO, R.; GIL, P.; CANO, A.; VENDRELL, J. LEZ-CLEMENTE, J. M. G. Advanced glycation end products are associated with arterial stiffness in type 1 diabetes. **J endocrinol**, Espanha v. 221, n.3, p. 405-413, jun., 2014.

LOPES, P. C. C.; BUSATO, P. M. R.; MÂNICA, M. F. M.; ARAÚJO, M. C.; ZAMPIVA, M. M. M.; BORTOLINI, B. M.; NASSAR, C. A.; NASSAR, P. O. Effect of basic periodontal treatment on glycemic control and inflammation in patients with diabetes mellitus type 1 and type 2: controlled clinical trial. **J Public Health**, Cascavel, v. 25, n. 4, p. 443-449, jan., 2017.

MARIAT, D.; FIRMESE, O.; LEVENEZ, F.; GUIMARÃES, V.; SOKOL, H.; DORÉ, J.; CORTHIER, G.; FURET, J. P. The firmicutes/bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. **BMC microbiol.**, França, v.9, n.9, p.123, jun., 2009.

MATTOS, L. F. C., SANTOS, C. M. M. L.; ROXO, M. A. P.; TEREZAN, M. L. F. Possível associação entre doença periodontal e doenças intestinais inflamatórias crônicas. **Braz J Periodontol**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 3, p. 17-23, set., 2014.

MEJIA-LEO, M. E.; PETROSINO, J. F.; AJAMI, N. J.; DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; LA BARCA, A. M. C. Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. **Scientific Reports**, Mexico, v. 4, n. 3814, p. 1-5, jan., 2014.

MENEGAT, J. S.; LIRA-JUNIOR, R.; SIQUEIRA, M. A.; BRITO, F.; CARVALHO, A. T.; FISCHER, R. G.; FIGUEREDO, C. M. Cytokine expression in gingival and intestinal tissues of patients with periodontitis and inflammatory

bowel disease: An exploratory study. **Arch Oral Biol**, Rio de Janeiro, v. 66, n.1, p.141-146, mar., 2016.

MESSORA, M. R.; OLIVEIRA, L. F. F.; FOUREAUX, R. C.; TABA-JUNIOR, M.; G. ZANGERÔNIMO, M. G.; FURLANETO, F. A. C.; PEREIRA, L. J. Probiotic Therapy Reduces Periodontal Tissue Destruction and Improves the Intestinal Morphology in Rats With Ligature-Induced Periodontitis. **J Periodontol**, São Paulo, v. 84, n. 12, p. 1818-1826, dez., 2013.

MORAES, A. C. F.; SILVA, I. T.; ALMEIDA-PITITTO, B.; FERREIRA, S. R. G. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 58, n. 4, p. 317- 327, jun., 2014.

MUHVIĆ-UREK, M.; TOMAC-STOJMENOVIĆ, M.; MIJANDRUŠIĆ-SINČIĆ, B. Oral pathology in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, Croácia, v. 22, n. 25, p. 5655-5667, jul., 2016.

NAKAJIMA, M.; ARIMATSU, K.; KATO, T.; MATSUDA, Y. MINAGAWA, T.; TAKAHASHI, N.; OHNO, H.; YAMAZAKI, K. Oral administration of p. gingivalis induces dysbiosis of gut microbiota and impaired barrier function leading to dissemination of enterobacteria to the liver. **PLoS ONE**, Japão, v. 10, n. 7, p.1-15, jun., 2015.

NASSAR, C. A.; NASSAR, P. O.; INAGAKI, N. S.; GIRELLI JUNIOR, C. Efeito de antiinflamatório no desenvolvimento da doença periodontal induzida. Avaliação radiográfica em ratos. **Rev Odonto Unesp**, Araraquara, v. 32, n. 2, p. 125-130, jul./dez., 2003.

NASSAR, P. O. NASSAR, C. A.; GUIMARÃES, M. R.; AQUINO, S. G.; ANDIA, D. C.; MUSCARA, M. N.; SPOLIDORIO, D. M. ROSSA JUNIOR, C.; SPOLIDORIO, L. C. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. **J Periodontal Res**, Copenhagen, v. 44, n. 4, p. 479-488, ago., 2009.

OLIVEIRA, L. S.; LIRA-JUNIOR, R.; FIGUEREDO, C. M.; GOMES, M. B.; FISCHER, R. G. Self-Reported Periodontitis and Complications in Type 1 Diabetes Patients: A Brazilian Nationwide Survey. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 5, p. 599-603, set/out., 2016.

OZ, H. S.; CHEN, T.; EBERSOLE, J. L. A model for chronic mucosal inflammation in ibd and periodontitis. **Dig Dis Sci**, Kentucky v. 55, n.8, p. 2194-2202, nov., 2009.

PAPAPANOU, P. N.; SANZ, M.; BUDUNELI, N.; DIETRICH, T.; FERES, M.; FINE, D. H.; FLEMMIG, T. F.; GARCIA, R.; GIANNOBILE, W. V.; GRAZIANI, F.; GREENWELL, H.; HERRERA, D.; KAO, R. T.; KEBSCHULL, M.; KINANE, D. F.; KIRKWOOD, K. L.; KOCHER, T.; KORNMAN, K. S.; KUMAR, P. S.; LOOS, B. G.; MACHTEI, E.; MENG, H.; MOMBELLI, A.; NEEDLEMAN, I.;

OFFENBACHER, S.; SEYMOUR, G. J.; TELES, R.; TONETTI, M.
S.Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **J Periodontol**, Copenhagen, v. 89, n.1, p. 173-182, jun, 2018.

PELLEGRINI, S.; SORDI, V.; BOLLA, A. M.; SAITA, D.; FERRARESE, R.; CANDUCCI, F.; CLEMENTI, M.; INVERNIZZI, F.; MARIANI, A.; BONFANTI, R.; BARERA, G.; TESTONI, P. A.; DOGLIONI, C.; EMANUELE, B.; PIEMONTE, L. Duodenal Mucosa of Patients With Type 1 Diabetes Shows Distinctive Inflammatory Profile and Microbiota. **J Clin Endocrinol Metab**, Itália, v. 102, n. 5, p. 1468-1477, mai., 2017.

PIETROPAOLI, D.; PINTO, R. D.; CORRIDONI, D.; RODRIGUEZ-PALACIOS, A.; DI STEFANO, G.; MONACO, A.; WEINBERG, A.; COMINELLI, F. Occurrence of spontaneous periodontal disease in the samp1/ yitfc murine model of crohn disease. **J Periodontol**, Cleveland, v. 85, n.12, p. 1799-1805, dez., 2014.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet**, Minneapolis, v. 366, n. 9499, p. 1809-1820, nov., 2005.

PIMENTEL, S.P.; CASATI, M. Z.; RIBEIRO, F. V.; CORRÊA, M. G. FRANCK, F. C.; BENATTI, B. B.; CIRANO, F. R. Impact of natural curcumin on the progression of experimental periodontitis in diabetic rats. **J Periodontal Res**, Maranhão, v.55, n.1, p. 1-10, jan., 2019.

PRESHAW, P. M.; ALBA, A. L.; HERRERA, D.; JEPSEN, S.; KONSTANTINIDIS, A.; MAKRILAKIS, K.; TAYLOR, R. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. **Diabetologia**, Newcastle, v. 55, n. 1, p. 21-31, jan., 2012.

PUGLIESE, A. Autoreactive T cells in type 1 diabetes. **J Clin Invest**, Florida, v. 127, n. 8, p. 2881-2891, ago., 2017.

REINEHR, T. Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. **World J Diabetes**, Germany, v.15, n.6, p.270-281, dez., 2013.

RIBEIRO, C. A. O.; GROTZNER, S. R.; DOS REIS FILHO, H. S. **Técnicas e Métodos para Utilização Prática em Microscopia**. São Paulo: Editora Santos, 2012.

RIBEIRO, F. V.; DE MENDONÇA, A. C.; SANTOS, V. R.; BASTOS, M. F.; FIGUEIREDO, L.C.; DUARTE, P. M. Cytokines and bone-related factors in systemically healthy patients with chronic periodontitis and patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. **J Periodontol**, São Paulo, v. 82, n.8, p.1187-1196, ago., 2011.

RODRIGUEZ-CALVO, T.; RICHARDSON, S. J.; PUGLIESE, A. Pancreas Pathology During the Natural History of Type 1 Diabetes. **Current Diabetes Report**, Germany, v. 18, n. 124, p. 1-12, out., 2018.

SÁNCHEZ, L. M.; LUCCA, R. C.; LEWICKI, M.; UBIOS, A. M. Long term bone alterations in aged rats suffering type 1 diabetes. **Experimental Gerontology**, Buenos Aires, Argentina, v. 1, n. 85, p. 9-12, set., 2016.

SEMENKOVICH, C. F.; DANSKA, J.; DARSOW, T.; DUNNE, J. L.; HUTTENHOWER, C.; INSEL, R. A.; McELVAINE, A. T.; RATNER, R. E.; SHULDINER, A. R.; BLASER, M. L. J. American Diabetes Association and JDRF Research Symposium: Diabetes and the Microbiome. **Diabetes**, St. Louis, v. 64, n. 12, p. 3977-3977, dez., 2015.

SHANMUKAPPA, S. M.; NADIG, P.; PUTTANNAVAR, R.; AMBAREEN, Z.; GOWDA, T. M.; MEHTA, D. S. Knowledge, attitude, and awareness among diabetic patients in davangere about the association between diabetes and periodontal disease shruthi mavinahally. **J Int Soc Prevent Communit Dent**, Karnataka, Índia, v. 7, n. 38, p. 1-8, nov./dez., 2017.

SILVA, V. O.; LOBATO, R. V.; ANDRADE, E. F.; ORLANDO, D. R.; BORGES, B. D. B.; ZANGERONIMO, M. G.; SOUSA, R. V.; J. PEREIRA, L. J. Effects of β -Glucans Ingestion on Alveolar Bone Loss, Intestinal Morphology, Systemic Inflammatory Profile, and Pancreatic β -Cell Function in Rats with Periodontitis and Diabetes. **Nutrients**, Minas Gerais, v. 9, n. 9, p.1-13, set., 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017- 2018. **Clannad**, São Paulo, p. 1-383, jan/dez., 2017.

SPAENDONK, H. V.; CEULEERS, H.; WITTERS, L.; PATTEET, E.; JOOSSENS, J.; AUGUSTYNS, K.; LAMBEIR, A-M.; DE MEESTER, I.; MAN, J. G.; WINTER, B. Y. Regulation of intestinal permeability: The role of proteases. **World J Gastroenterol**, Belgium, v. 23, n.12, p. 2106-2123, mar., 2017.

STEFFENS, J. P.; MARCANTONIO, R. A. C. Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares 2018: Guia Prático e Pontos-Chave. **Rev. Odontol UNESP**, São Paulo, v. 47, n. 4, p. 189-197, jul/ago., 2018.

STEVENS, A.; LOWE, J. S. **Histologia humana**. 2. Ed. São Paulo: Manole, 2001.

STUANI, V. T.; SANT'ANA, A. C. P.; SOARES JUNIOR, L. V.; SILVA, P. S. A relação entre doença periodontal e o câncer oral. **Rev Bras Odontol**, Rio de Janeiro, v. 73, n. 3, p. 218-22, jul./set., 2016.

TARIQ, M.; IQBAL, Z.; ALI, J.; BABOOTA, S.; TALEGAONKAR, S.; AHMAD, Z.; SAHNI, J. K. Treatment modalities and evaluation models for periodontitis. **Int J Pharm Investig**, New Delhi, v. 2, n. 3, p. 106-122, julho, 2012.

TETTAMANTI, L.; GAUDIO, R. M.; CURA, F.; MUCCHI, D.; ILLUZZI, N.; TAGLIABUE, A. Prevalence of periodontal pathogens among Italian patients with chronic periodontitis: A retrospective study on 2992 patients. **ORAL & implantology**, Abingdon, v. 10, n. 1, p. 28, jan/mar, 2017.

TOYAMA, G.; FELIPETTI, F. A.; BERTOLDO, K. P.; VIERA, C. S.; KOTTWITZ, L. B. M.; NASSAR, C. A.; NASSAR, P. O. Evaluation of different periodontal treatments modes for patients with type 2 diabetes mellitus. **J Public Health.**, Cascavel, v. 22, n.1, p. 529-534, dez, 2014.

TORRUNGRUANG, K.; JITPAKDEEBORDIN, S.; CHARATKULANGKUN, O.; GLEEBBUA, Y. Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, and Treponema denticola / Prevotella intermedia Co-Infection Are Associated with Severe Periodontitis in a Thai Population. **Plos One**, San Francisco, v. 10, n. 8, p. 13, ago., 2015.

VAARALA, O. Is the origin of type 1 diabetes in the gut?. **Immunol Cell Biol**, Finland, v. 90, n1, p. 271-276, jan., 2012.

VIUK, F.; DICKSVED, J.; LAM, S. Y.; FUHLER, G. M.; VAN DER LAAN, L.; VAN DE WINKEL, A.; KONSTANTINOV, S. R.; SPAANDER, M.; PEPPELENBOSCH, M. P.; ENGSTRAND, L.; KUIPERS, E. J. Composition of the mucosa-associated microbiota along the entire gastrointestinal tract of human individuals. **United European Gastroenterol j**, Netherland, v. 7, n. 7, p. 897-907, ago., 2019.

WADE, W. G. The oral microbiome in health and disease. **Pharmacol Res**, Londres, v. 69, n 1, p. 137-143, nov., 2013.

WU, Y-Y.; XIAO, E.; GRAVES, D.T. Diabetes mellitus related bone metabolism and periodontal disease. **Int J Oral Sci**, China, v. 7, n. 2, p. 63-72, jun., 2015.

YUCE, H. B.; AKBULUT, N.; OCAKLI, S.; KAYIR, O.; MAHFUZ, E. The effect of commercial conjugated linoleic acid products on experimental periodontitis and diabetes mellitus in Wistar rats. **Acta Odontol Scand**, Turkey, v. 75, n. 1, p. 21-29, nov., 2016.

ZIUKAITE, L.; SLOT, D. E.; VAN DER WEIJDEN, F. A. Prevalence of diabetes mellitus in people clinically diagnosed with periodontitis: a systematic review and meta-analysis of epidemiologic studies. **J Clin Periodontol**, Netherlands, v.45, n. 6, p.650-662, jun, 2018.

7. ARTIGO CIENTÍFICO

Dear Dr Nassar,

Thank you for submitting your manuscript,
"Effects of the association of Periodontitis and Type 1 Diabetes Mellitus induced on periodontal tissues and the duodenal mucosa of wistar rats", to Inflammation

The submission id is: IFLA-D-20-00371
Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

Your username is: patricia.nassar
If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/ifla/>.

With kind regards,

The Editorial Office
Inflammation

As a result of the significant disruption that is being caused by the COVID-19 pandemic we are very aware that many researchers will have difficulty in meeting the timelines associated with our peer review process during normal times. Please do let us know if you need additional time. Our systems will continue to remind you of the original timelines but we intend to be highly flexible at this time.

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

Artigo científico de acordo com as normas da revista (Anexo 2).

INFLAMMATION

Effects of the association of Periodontitis and Type 1 Diabetes Mellitus induced on periodontal tissues and the duodenal mucosa of wistar rats

Iohana Ferreira Choptian Fiorese¹, Jossinelma Camargo Gomes¹, Bianca Caroline Custódio dos Santos¹, Franciane Wachter², Ediana Amanda Piana², Rose Meire Costa Brancalhão³, Sabrina Grassioli⁴, Carlos Augusto Nassar⁵ and Patrícia Oehlmeyer Nassar⁵

¹ Master's degree in Biosciences and Health, State University of Western Paraná, Cascavel, Paraná, Brazil

²

³ Laboratory of Structural and Functional Biology, State University of Western Paraná, Brazil

⁴ Department of Periodontology, School of Dentistry, State University of Western Paraná, Cascavel, Paraná, Brazil

⁵ Department of Periodontology, School of Dentistry, State University of Western Paraná, Cascavel, Paraná, Brazil

⁵ To whom correspondence should be addressed at Torres Avenue, number 200, house 249, FAG, Cascavel, Paraná Postal Code 85806-095, Brazil. E-mail: ponassar@yahoo.com

ABSTRACT

histomorphometric and radiographic aspects of the periodontal tissues and intestinal mucosa (duodenum). 40 Wistar rats were used: 1) Control Group (CG); 2) Group of periodontal disease (PD); 3) Type 1 diabetes mellitus group (T1DM); 4) Type 1 diabetes mellitus + periodontal disease group (T1DM + PD). In groups T1DM and T1DM + PD, T1DM induction was performed with the administration of streptozotocin (STZ) 80 mg / kg intraperitoneal body weight. The PD and T1DM + PD groups were submitted to PD induction with ligation. After the experimental phase and euthanasia, histological, radiographic and morphological analyzes were performed. For data analysis, was used the one-way ANOVA and post-test Tukey ($p < 0.05$). The T1DM + PD group had a significantly higher level of fasting blood glucose compared to the other groups. In radiographic and histomorphometric analyzes, the T1DM + PD group showed greater alveolar bone loss compared to the control group. The T1DM + PD group showed greater osteoclastic activity compared to the control, T1DM and PD groups ($p < 0.05$). The heights of the intestinal villi were statistically higher in the PD, T1DM, T1DM + PD groups, compared to the control. Regarding the height of the crypt, only the T1DM and T1DM + PD groups were significantly higher compared to the other groups. Association of diabetes and periodontitis increased the deleterious effects on bone tissue and adverse effect on the permeability of the duodenal mucosa.

Keywords: Periodontitis. Diabetes Mellitus. Duodenum. Inflammation.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Iohana Ferreira Choptian Fiorese, Bianca, Jossinelma, Franciane Wachter, Ediana Amanda Piana - clinical and experimental studies, data and statistical analysis; manuscript preparation, editing and review.

Rose Meire Costa Brancalhão, Sabrina Grassioli - experimental studies, data and statistical analysis; manuscript preparation.

Carlos Augusto Nassar, Patricia Oehlmeyer Nassar - definition of intellectual content; design; clinical and experimental studies, data and statistical analysis; manuscript preparation, editing and review.

Conflicts of interest

All the authors declare no conflict of interest in this study.

INTRODUCTION

Periodontal disease (PD) is considered an essential public health problem due to its high prevalence in humanity; its severe form affects about 740 million people worldwide [1].

This disease is a complex infectious inflammatory condition with multifactorial contributing factors that destroy dental support tissues leading to alveolar bone destruction and tooth loss. The understanding of the dynamic interactions between the various periodontal pathogens and the inflammatory immunosuppression mediated by the host responses has increased significantly, highlighting the genetic, epigenetic, lifestyle, and environmental factors in the pathogenesis of periodontitis [2]. In this context, studies have indicated that diabetic/hyperglycemic states increase the risk for the development and progression of the periodontitis, and are associated with future tooth loss, especially in a poorly controlled glycemic state [3,4].

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) consists of metabolic disorders and is characterized by an increase in the level of glucose in the blood (hyperglycemia), due to the absence of the hormone insulin. It is an autoimmune disease in which pancreatic β cells are destroyed [5]. It is subdivided into Type 1A diabetes mellitus and Type 1B diabetes mellitus, depending on the laboratory presence or absence of circulating autoantibodies, respectively [6].

Diabetes is a risk factor for periodontitis, just as periodontitis worsens the glycemic control of diabetes [7]. The bidirectional relationship between these diseases is due to the interaction of AGEs (advanced glycation end-products) with their receptors (RAGEs - advanced glycation end-products receptors). Regularly, in healthy individuals, the formation of AGEs occurs slowly; on the other hand, in diabetic individuals, they form quickly due to the high availability of circulating glucose [8].

The formation of the AGEs-RAGEs complex is directly linked to the onset and severity of diabetic complications. This link increases the inflammatory response of the dental biofilm; this occurs when cells are activated by AGEs, causing an increase in the production of cytokines, such as interleukin-17 (IL-17) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), which play a fundamental role in bone resorption. IL-17 is produced by T-helper cells (Th17) and is associated with periodontal inflammatory development, which can act on the regulation of TNF- α , favoring the sequence of local inflammatory events and possible tissue damage [9,10].

In this study [11], the authors report that the expression of TNF- α is increased in the exacerbated inflammatory process of PD and T1DM. TNF- α has been identified as a potent competitor of insulin receptors, increasing blood glucose levels [7,8,12,13].

Inflammation is the link between PD and T1DM. The increase in AGEs-RAGEs in individuals with T1DM causes changes in the immune-inflammatory response by the host to the microbial plaque in PD; consequently, this increase in AGEs, related to its receptors in gingival tissue, is the primary mechanism of destruction of the periodontium in patients with T1DM [8,14].

The inflammatory response that occurs in PD and T1DM generates situations of low-grade systemic inflammation, leading to speculation that these diseases are associated with inflammatory bowel diseases [1,15]. The clinical manifestations of inflammatory bowel diseases (IBD) can occur in all parts of the intestine, such as the small intestine. This part of the intestine comprises the duodenum, jejunum, and

ileum, and it is there that the absorption of nutrients from the products of digestion occurs. Morphologically, the duodenum is composed of villi and the crypts of Lieberkuhn, which assist in the absorption process [16].

In the duodenum, the presence of beneficial bacteria, called intestinal microbiota, when in equilibrium, plays an essential role in immunological, nutritional, and pathological processes [17]. In rats with induced periodontitis, a shortening of the villi in the jejunum was observed, in addition to epithelial stratification, degeneration of the basal lamina, and infiltration with neutrophils in the small intestine, when compared to the control group [18].

T1DM patients showed signs of chronic and latent inflammation and macroscopic impact [19]. There was an increase in intestinal permeability and less microbial diversity in the duodenal mucosa. It was observed that these patients had an increase in firmicutes and a decrease in bacteroids compared to the healthy control group. The authors suggest that these changes that occur in the intestinal mucosa of diabetics could be the primary key to the change in the immune response in the intestine.

Considering the strong relationship between T1DM and PD, and the absence of studies on the effects of these diseases on the intestinal mucosa, the objective of this study was to evaluate the effect of the association of periodontal disease and T1DM under histomorphometric and radiographic aspects of the tissues periodontal and intestinal mucosa (duodenum).

METHODOLOGY

Study Design

This research is of a fundamental, quantitative, and descriptive nature, being an experimental procedure in an animal model [20]. It was held at the Laboratory of Endocrine Physiology and Metabolism, at the Laboratory of Structural and Functional Biology (LABEF), linked to the Western Paraná State University - UNIOESTE, Campus of Cascavel.

Sampling

For this study, 40 Wistar rats from the central vivarium of UNIOESTE were used, weighing an average of 100g each. They were kept in the sectoral vivarium of the Physiology and Endocrinology Laboratory under controlled conditions of temperature ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) and light (12-hour light-dark cycle). They received water and pet food for rodents at will. The animals were then randomly divided into four groups according to Figure 1.

Due to the excess of glucose in the bloodstream and the exacerbated inflammatory process of periodontal disease, six animals in the T1DM + PD group and two animals in the T1DM group did not support the complications resulting from the association of the diseases and died. Therefore, at the end of the experiment, the groups were divided into: Control Group (CG) n = 10; Periodontal Disease Group (PD) n = 10; Type 1 Diabetes Mellitus Group (T1DM) n = 8, and Type 1 Diabetes Mellitus Group + Periodontal Disease (T1DM + PD) n = 4.

Type 1 Diabetes Mellitus Induction

After seven days of acclimatization, for the induction of T1DM, the animals of the T1DM and T1DM + PD groups were submitted to a single administration of Streptozotocin (STZ) 80 mg/kg of intraperitoneal body weight. Blood samples were collected from the animals' tails 48 hours after induction to measure glucose levels. A commercial kit (Gold Analisa ®) was used. These animals showed glucose concentrations between 200mg/dL to 650mg/dL and, therefore, were considered diabetic [21].

Periodontal Disease Induction

After seven days of acclimatization and two more days of T1DM induction (10th day of the experiment), the animals were anesthetized (xylazine 0.04 mg/kg and ketamine 0.08 mg/kg), and placed on an adapted operating table, which allowed the maintenance of the mouth opening, facilitating access to the teeth of the posterior region of the mandible. With the aid of a modified clamp and an explorer probe, a cotton thread size 40 was placed around the first lower molars, right and left [22]. This ligature acted as a gingival irritant and was maintained for ten days, favoring the accumulation of bacterial plaque and, consequently, the development of PD [2].

Experiment Organization Chart

The procedures for the development of the research were carried out following the scheme shown in Figure 2.

Euthanasia of Animals and Sample Collection

Euthanasia occurred on the 20th day of the experiment. First, the animals were desensitized in a CO₂ chamber, and later, decapitated with a guillotine. Hemi-mandibles were collected for radiographic and morphological analysis of periodontal tissues, blood for glucose analysis, and a duodenal portion for histological analysis.

Blood Collection for Glucose Concentration Dosage

At the time of euthanasia, blood from the brain stem was collected. The blood samples were centrifuged at 3000 rpm, and the plasma was separated and stored at -20°C for measuring glucose concentrations using a commercial kit (Gold Analisa ®).

Radiographic Analysis

Dissection of the left hemi-mandibles was performed. Then, radiographic shots were taken using a Dabi-Atlante R-X device, Spectro model with 70 Kvp and 8mA, maintaining a focus/film distance of 50

cm, and exposure time of 0.3 seconds. The hemi-mandibles were placed with the lingual side over the periapical radiographic film and positioned so that the buccal and lingual cusps of the first molars are in the same vertical plane.

The images were then digitized and analyzed in three measurements in the Sigma-Scan 2.0 program, and a linear measure was established between them, covering the distance from the cemento-enamel junction (CEJ) to the alveolar bone crest on the mesial side of the first maxillary molars and the lower ones on the left side, with measurements in centimeters [23].

Histological Analysis of the Mandibles

The hemi-mandibles on the right side were fixed in a 10% formaldehyde solution for 48 hours. After that period, they were washed in running water for 24 hours. The pieces were kept in the 5% trichloroacetic acid (TCA) descaling solution, prepared in the proportion of 100mL of distilled water to 5 mL of acid. The pieces were kept in the solution for approximately 20 days and were evaluated daily in order to verify the expected degree of descaling; the TCA descaler was changed every five days.

After this time interval, the pieces were rewashed under running water for 1 hour, and histological processing was carried out, in which the pieces went through the inclusion process, starting with the growing sequence of alcohols for dehydration and xylol for diaphanization. Afterward, the parts were added, and paraffin blocks were obtained (Purified Paraffin, code 1228, lot 1008459, Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brazil). They were cut in a semi-automatic microtome (Hestion®, ERM3000, Daintree and Scientific, St. Helens, Australia), and 7 mm thick slices were obtained, which were mounted on histological slides and stained using the hematoxylin and eosin (H&E) histochemical technique.

Microscopic analysis was performed by a single examiner through the evaluation of stained histological sections. The slides were analyzed with the aid of a commonly transmitted light microscope (Leica Microsystems, Switzerland) for morphological observations of the gingival tissue, alveolar process, and count of osteocytes, osteoclasts, and osteoblasts in the animals' hemi-mandibles.

Histological Analysis of the Duodenum

The tissue samples were opened at the mesenteric border and were fixed in buffered formaldehyde for 24 hours. Subsequently, the samples went through the dehydration process in a series of increasing concentrations of alcohol and diaphanization in a series of concentrations of xylol. After these processes, samples were included in paraffin previously heated to 60°C; the tissue elements of the sample were infiltrated by paraffin, which solidified at room temperature, facilitating the 7 mm thick semi-serial histological sections, stained using the H&E method. The morphometric analysis was performed by sampling images captured in a 4x objective in the Olympus optical microscope with an Axioscop 2 Plus Zeiss image capture kit. The thickness was estimated from the measurement of 10 random points/cut, making 100 measurements/animal through the image analysis system (Image-Pro Plus® 4.5 - Media Cybernetics, USA), with results expressed in μm . The villus height was measured through the vertical distance between the villus tip and the villus-crypt junction level of 10 villi in five different fields of each sample. Subsequently, the depth of the intestinal crypts was also estimated, measuring the vertical distance between the villus-crypt junction and the lower limit of 10 crypts in five different fields of each sample.

Ethical Aspects

This project was approved by UNIOESTE's Ethics Committee on Animal Experimentation and Practical Classes (CEEAAP).

Statistical Analyses

The results were analyzed using Bioestat - version 5.3 (Mamirauá Institute for Sustainable Development, Brazil, AM). After tested, the distribution was considered normal, and the variance was homogeneous; the parametric tests ANOVA One-Way followed by Tukey's multiple comparison test were used. The observed differences were considered significant when $p < 0.05$ (5%).

RESULTS

Fasting Glucose Concentration Analysis

According to Graphic 1, all groups analyzed differed significantly concerning fasting glucose. The group that least differed was the PD when compared to the control group. The T1DM group, on the other hand, had a high level of fasting glucose compared to the control group and the PD. However, the group presenting the two associated diseases (T1DM + PD) had a significant increase in relation to T1DM and the other treatments.

Graphic 1

Radiographic and histomorphometric analysis of the measurement from CEJ to the alveolar bone crest

Through radiographic and histomorphometric evaluations described in Table 1, the animals in the PD, T1DM, and T1DM + PD groups showed more significant alveolar bone loss when compared to the Control group ($p < 0.05$). The T1DM group showed a significant increase compared to the control group. In turn, for the PD group, it was higher than the control group and the T1DM group. However, when we analyze the two associated diseases (PD + T1DM), the group stands out as being the one with the most considerable distance from CEJ to the alveolar bone crest.

Table 1

Histomorphometric analysis to quantify osteocytes, osteoblasts, and osteoclasts

According to the results presented in Table 2 and illustrated in Figure 3, it was possible to observe that the groups PD, T1DM, and T1DM + PD obtained significant differences in the count of osteocytes and osteoblasts among themselves and presented a smaller amount of osteocytes and osteoblasts compared to

the control group ($p < 0.05$). The T1DM + PD group showed higher osteoclastic activity compared to the control, T1DM, and PD groups ($p < 0.05$). When comparing the T1DM group with the control group, it showed no statistical difference in the number of osteoclasts.

Table 2 and Figure 3

Histomorphometric analysis of the duodenum

Through the analysis of the duodenum, the PD, T1DM, and T1DM + PD groups showed significant differences between them, and all differed statistically from the control group to the measurement of villus height. There was no statistical difference in the PD group compared to the control group about the height of the crypt; however, the T1DM + PD and T1DM groups showed an increase in the crest height in relation to the control group ($p < 0.05$) shown in Table 3 and illustrated in Figure 4.

Table 3 and Figure 4

DISCUSSION

PD, in association with chronic inflammatory diseases, has been studied over the years. The experimental model of PD associated with T1DM has been the focus of studies in animals to clarify the effect of diabetes on the periodontium. Furthermore, the bidirectional relationship between these diseases triggers a series of systemic tissue changes in organs such as the mouth and the small intestine [13,24]. The present study evaluated the structural changes in the gingival tissues and intestinal mucosa (duodenum) in an experimental model submitted to periodontitis and induced T1DM. Similar methods of induction were used in the study by Nassar et al. and Silva et al. respectively, with reduced experimental time in days according to the study by Pimentel et al., thus bringing the efficiency of the PD installed in fewer days of suffering for the animal, reducing the chances of sample loss. However, our study presented a loss of animals in groups T1DM and T1DM + PD throughout the experiment.

The negative effect of persistent inflammation that occurs in periodontitis on glycemic control is related to the manifestation of severe hyperglycemic symptoms in diabetic patients [13,25]. Similarly, animals submitted to concomitant PD and T1DM tend to have high blood glucose levels, as shown by the results of this study. The animals in the T1DM + PD group, at the end of the experiment, had glycemia close to 800mg/dL, differently from the T1DM group, which remained at an average of 600mg/dL (Figure 1), considered severe diabetes when the blood glucose is higher than 280mg/dL. These results lead to an understanding that the exacerbated inflammation of the PD and its deleterious action contributed to the increase of glycemia in the animals of the T1DM + PD group.

Hyperglycemia appears to be the aggravating fuel for the destruction of the periodontium in people with diabetes with periodontitis. Some experimental studies, which radiographically and histometrically evaluated periodontal conditions in animals with T1DM and PD, showed the presence of periodontal inflammation followed by severe alveolar bone loss due to the significant increase in osteoclasts and decreased osteoblasts [11,21,26].

From a theoretical point of view, bone formation and progression of resorption are in balance under

normal physiological conditions, in which bone resorption is regulated by osteoclasts preceding a new bone formation by osteoblasts. What happens in PD is an excess of osteoclastic activity, followed by an osteoblastic decrease, so that the formation of new bone tissue is impaired. The presence of diabetes, in turn, induces an imbalance in this process of bone remodeling, causing resorption to exceed bone formation [26]. These data corroborate the findings of the present study (Table 1), which showed more significant alveolar bone loss and severe destruction of periodontal tissue shown by the distance between CEJ and ABC in the T1DM + PD group when compared to the control group and the PD group ($p < 0.05$), both radiographically and histometrically. In the cell count, the results presented also corroborate with the literature when the T1DM + PD group presented exacerbated osteoclastic activity and a significant decrease in osteoblasts when compared to the PD group (Table 2). The negative influence of T1DM, in the face of the continuous infectious stimulus and the inflammatory response in the damaged bone tissue, may be the cause of the severe periodontal destruction presented.

Although the clinical relationship between PD and T1DM is well established, few studies have evaluated the intestinal morphology in rats subjected to these diseases simultaneously. Evidence suggests that the effects caused by them are not limited to a single location in the body, but have systemic consequences [21,27]. Diabetic and periodontitis patients tend to present an imbalance in the intestinal microbiome, causing structural changes in the villi and intestinal crypts, thus altering the permeability [1,28]. In this study, histomorphometric analyzes showed that diabetic animals showed a significant increase in villus height and a different crypt than non-diabetic animals. These findings are in accordance with the study by Silva et al., indicating an increase in the capacity of the intestinal mucosa to absorb nutrients, such as simple carbohydrates, responsible for promoting glycemic spikes.

Similarly, periodontitis appears to interfere with intestinal morphology; the increase in the height of intestinal villus in animals with periodontitis may be related to the absorption of nutrients, increasing the apparent permeability (Table 3). These findings are divergent from the study by Messora et al., which shows a shortening of the villi. That study highlights that the due changes are associated with the presence of toxins and the high amount of bacteria in the gastrointestinal tract.

On the other hand, the intestinal changes (duodenum) found in this study (Table 3) are based on the findings of the T1DM + PD group. The diabetic and periodontitis animals presented a considerable structural modification concerning the height increase both of the villus and crypt when compared to the other groups. The effects of hyperglycemia, together with the systemic effects of periodontitis, seem to have a strong negative influence on the permeability of the duodenal mucosa, altering the intestinal barrier, which may be related to metabolic conditions and exacerbated immune responses [21].

CONCLUSION

The association of ligature-induced periodontitis and T1DM increased the deleterious effects on bone tissue with intense bone loss from JCE to ABC, and higher bone resorption was observed in the increase in osteoclasts and the decrease in osteocytes and osteoblasts. Effects also occurred in the intestinal mucosa, with exacerbation of the effects on the height of the villi and crypts of the duodenum, with a consequent adverse effect on the of the duodenal mucosa permeability.

REFERENCIAS

- 1 Lira-junior, R., and C.M. Figueredo. 2016. Periodontal and inflammatory bowel diseases: Is there evidence of complex pathogenic interactions? *World J Gastroenterol* 22 (35): 7963- 7972.
- 2 Pimentel, S.P., M.Z. Casati, F.V. Ribeiro, M.G. Corrêa, F.C. Franck, B.B. Benatti, and F.R. Cirano. 2019. Impact of natural curcumin on the progression of experimental periodontitis in diabetic rats. *J Periodontal Res.* (00): 1-10.
- 3 Ribeiro, F.V., A.C. de Mendonça, V.R. Santos, M.F. Bastos, L.C. Figueiredo, and P.M. Duarte. 2011. Cytokines and bone - related factors in systemically healthy patients with chronic periodontitis and patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. *J Periodontol.* (82): 1187 - 1196.
- 4 Ziukaite, L., D.E. Slot, and F.A. Van der Weijden. 2018. Prevalence of diabetes mellitus in people clinically diagnosed with periodontitis: a systematic review and meta - analysis of epidemiologic studies. *J Clin Periodontol.* (45): 650 - 662.
- 5 Shanmukappa, S.M., P. Nadig, R. Puttannavar, Z. Ambareen, T.M. Gowda, and D.S. Mehta. 2017. Knowledge, attitude, and awareness among diabetic patients in davangere about the association between diabetes and periodontal disease shruthi mavinahally. *J Int Soc Prevent Communit Dent.* 7 (38): 1-8.
- 6 Sociedade Brasileira de Diabetes. 2017.Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017- 2018. São Paulo: *Clannad.*
- 7 Preshaw, P.M., A.L. Alba, D. Herrera, S. Jepsen, A. Konstantinidis, K. Makrilakis, and R. Taylor. 2012. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia* 55 (1): 21-31.
- 8 Kerbauy, W.D., F.R. Lima, F.A. Perrella, and J.B.O. Amorim. 2008. Produtos finais de glicosilação avançada (age) e a exacerbação da doença periodontal em diabéticos – revisão de literatura advanced glycation end products (age) and the exacerbation of periodontal disease in diabetics patients – review. *R. Periodontia* 18 (3): 20-27.
- 9 Costa, T.A., M.J.B. Silva, P.M. Alves, J.E.Z.B. Chica, E.Z. Barcelos, M.A.A. Giani, G.P. Garlet, J.S. Silva, V. Rodrigues-Júnior, D.B.R. Rodrigues, and C.R.B. Cardoso. 2015. biomarkers of advanced disease in nongingival tissues of chronic periodontitis patients. *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation* 2015 1-10.
- 10 Becklen, A., M. Ainola, M. Hukkanen, C. Gurgan, T. SORSA, and Y. T. Konttinen. 2007. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J. Dent. Res* 86 (4): 347-35.
- 11 Kim, J-H., A.R. Kim, Y.H. Choi, S. Jang, G-H. Woo, J-H. Cha, E-J. Bak, and Y-J Yoo. 2017. Tumor necrosis factor- α antagonist diminishes osteocytic RANKL and sclerostin expression in diabetes rats with periodontitis. *PLoS ONE* 12 (12): 1-13.
- 12 Brandão, D.F.L.M.O., A. P. G. Silva, and L.A.M. Penteado. 2011. Relação bidirecional entre a doença periodontal e o diabetes mellitus. Bidirectional relationship between periodontal disease and diabetes mellitus *Odontol. Clín. –Cient* 10 (2): 117-120.
- 13 Almeida, B.B., A.C.R. Ferreira, A.P.G. Queiroz, G.N. Dornelas, and M.M.S.T. Coelho. 2015. Condições periodontais em portadores de diabetes mellitus atendidos no centro de referência sul fluminense de diabetes e hipertensão de vassouras-rj periodontal conditions in patients with diabetes mellitus attended in South Fluminense reference center for diabetes and hypertension of Vassouras-RJ. *Braz J Periodontol* 25 (4): 14-26.

- 14 Spaendonk, H.V., H. Ceuleers, L. Witters, E. Patteet, L. Joossens, K. Augustyns, A-M. Lambeir, I. de Meester, J.G. Man, and B.Y Winter. 2017. Regulation of intestinal permeability: The role of proteases. *World J Gastroenterol* 23 (12): 2106-2123.
- 15 Junqueira, L.C., J. Carneiro, and P. Abrahamsohn. 2017. *Histologia básica: texto e atlas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- 16 Moraes, A.C.F., I.T. Silva, B. Almeida-Pititto, and S. R. G. Ferreira. 2014. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. *Arq Bras Endocrinol Meta* 58 (4): 317- 327.
- 17 Messoria, M. R., L.F.F. Oliveira, R.C. Foureaux, M.G. Taba-Junior, M.G. Zangerônimo, F.A.C. Furlaneto, and L.J. Pereira. 2013. Probiotic Therapy Reduces Periodontal Tissue Destruction and Improves the Intestinal Morphology in Rats With Ligature-Induced Periodontitis. *J Periodontol* 84 (12): 1818- 1826.
- 18 Pellegrini, S., V. Sordi, A.M. Bolla, D. Saita, R. Ferrarese, F. Canducci, M. Clementi, et al. 2017. Duodenal Mucosa of Patients With Type 1 Diabetes Shows Distinctive Inflammatory Profile and Microbiota. *J Clin Endocrinol Metab* 102 (5): 1468- 1477.
- 19 Silva, V. O., R.V. Lobato, E.F. Andrade, D.R. Orlando, B.D.B. Borges, M.G. Zangerônimo, R.V. Sousa, et al. 2012. Effects of β -Glucans Ingestion on Alveolar Bone Loss, Intestinal Morphology, Systemic Inflammatory Profile, and Pancreatic β -Cell Function in Rats with Periodontitis and Diabetes. *Nutrients* 9 (9): 1-13.
- 20 Nassar, P.O., C.A. Nassar, M.R. Guimarães, S.G. Aquino, D.C. Andia, M.N. Muscara, D.M. Spolidorio, et al. 2009. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res* 44 (4): 479-488.
- 21 Nassar, C.A., P.O. Nassar, N.S. Inagaki, and C. Girelli Junior. 2003. Efeito de antiinflamatório no desenvolvimento da doença periodontal induzida. Avaliação radiográfica em ratos. *Rev Odonto Unesp* 32 (2): 125-130.
- 22 Bascones-Martínez, A., M. Muñoz-Corcuera, and J. Bascones-Llundain. 2015. Diabetes y periodontitis: una relación bidireccional. *Med Clin (Barc)* 145 (1): 31-35.
- 23 Oliveira, L.S., R. Lira-Junior, C.M. Figueredo, M.B. Gomes, and R.G. Fischer. 2016. Self-Reported Periodontitis and Complications in Type 1 Diabetes Patients: A Brazilian Nationwide Survey. *Braz Dent J* 27 (5): 599-603.
- 24 Yuce, H.B., N. Akbulut, S. Ocakli, O. Kayir, and E. Mahfuz. 2016. The effect of commercial conjugated linoleic acid products on experimental periodontitis and diabetes mellitus in Wistar rats. *Acta Odontol Scand* 75 (1): 21-29.
- 25 Mattos, L.F.C., C.M.M.L. Santos, M.A.P. Roxo, M.L.F. Terezan. 2014. Possível associação entre doença periodontal e doenças intestinais inflamatórias crônicas. Possible association between periodontal disease and chronic inflammatory bowel diseases. *Braz J Periodontol* 24(03): 17-23.
- 26 Ho, J., A.C. Nicolucci, H. Virtanen, A. Schick, J. Meddings, R.A. Reimer, C. Huang. 2019. Effect of probiotic on microbiota, intestinal permeability and glycemic control in children with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 104 (6): 4427–4440.

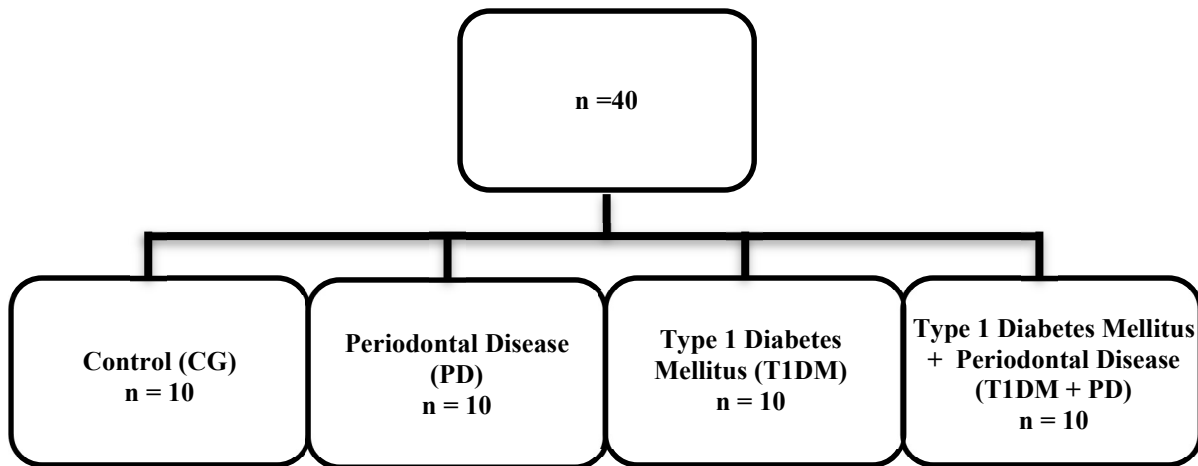


Figure 1 – Randomization scheme of experimental groups.

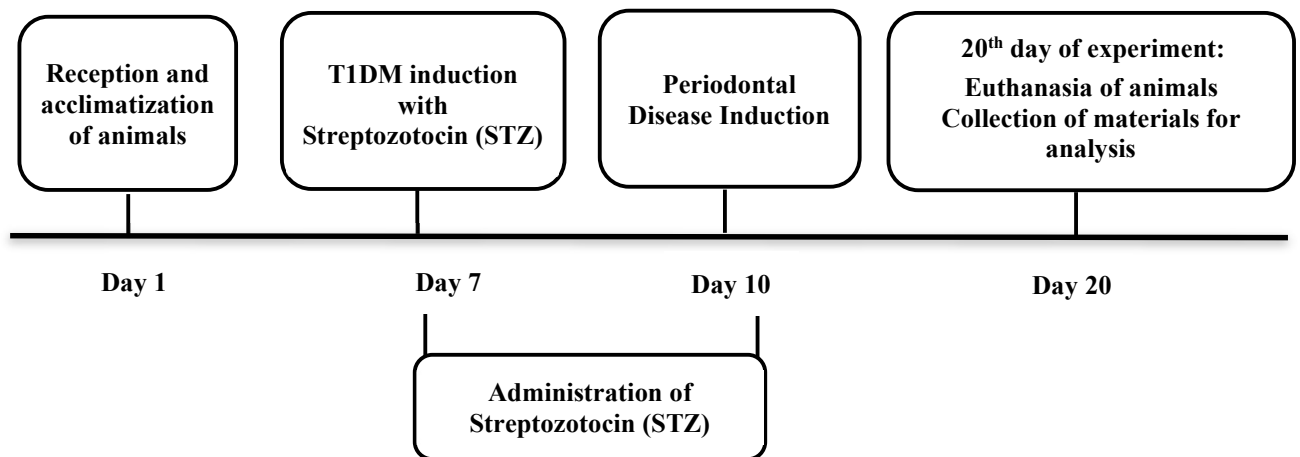


Figure 2 – Procedures for data collection, representation of the timeline containing the 20 days of the experiment.

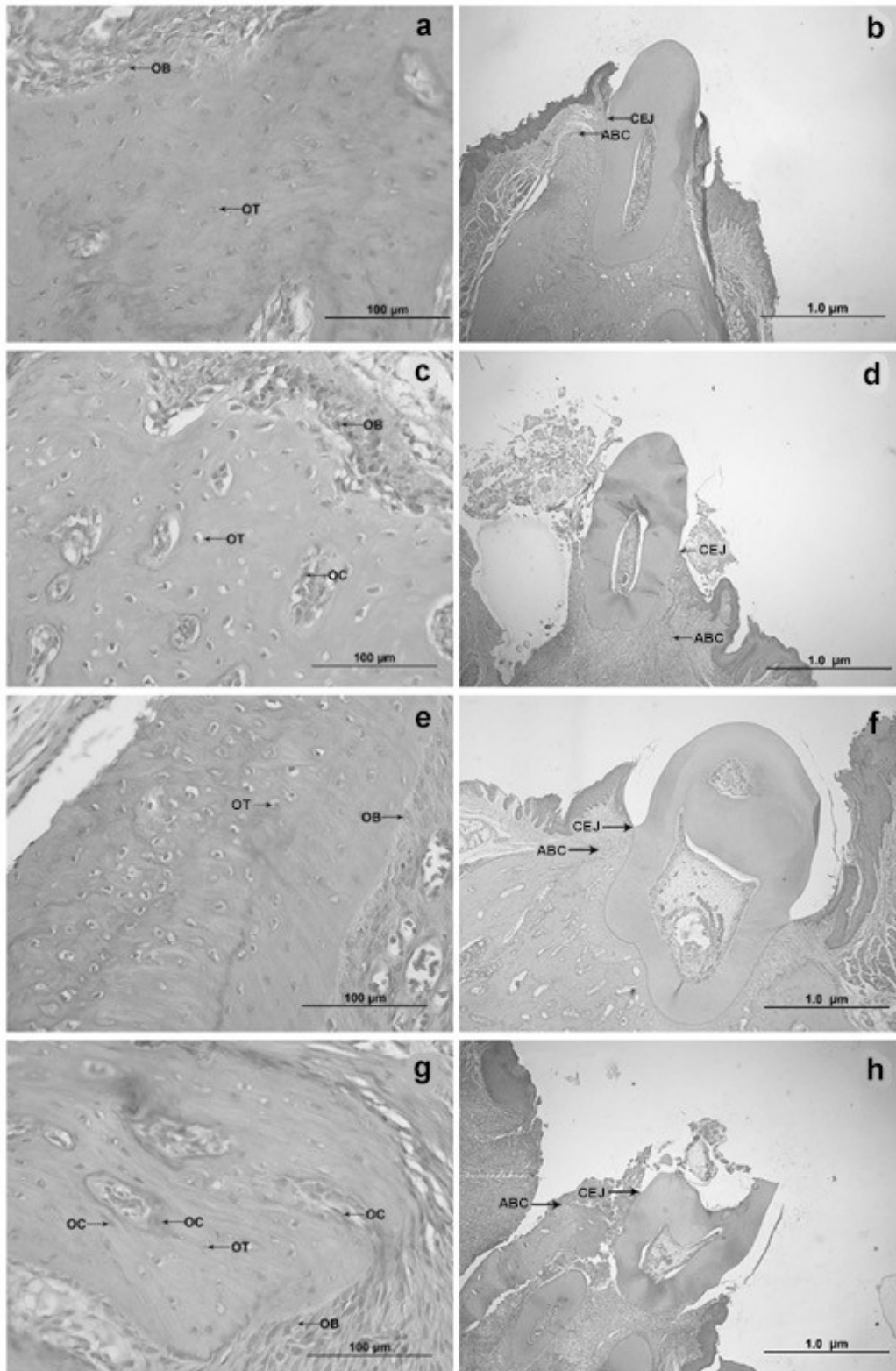


Figure 3. Representative photomicrographs of a sagittal section of the first mandibular molar. (a) and (b) - Representative photomicrographs of an animal in the control group. (c) and (d) - Representative photomicrographs of an animal in the PD group. (e) and (f) - Representative photomicrographs of an animal in the T1DM group. (g) and (h) - Representative photomicrographs of an animal from the PD + T1DM group. OB: Osteoblasts; OC: osteoclast; OT: osteocytes; JCE: Cemento-enamel junction; ABC: Alveolar bone crest. Hematoxylin and Eosin (H&E); 40x, 4x.

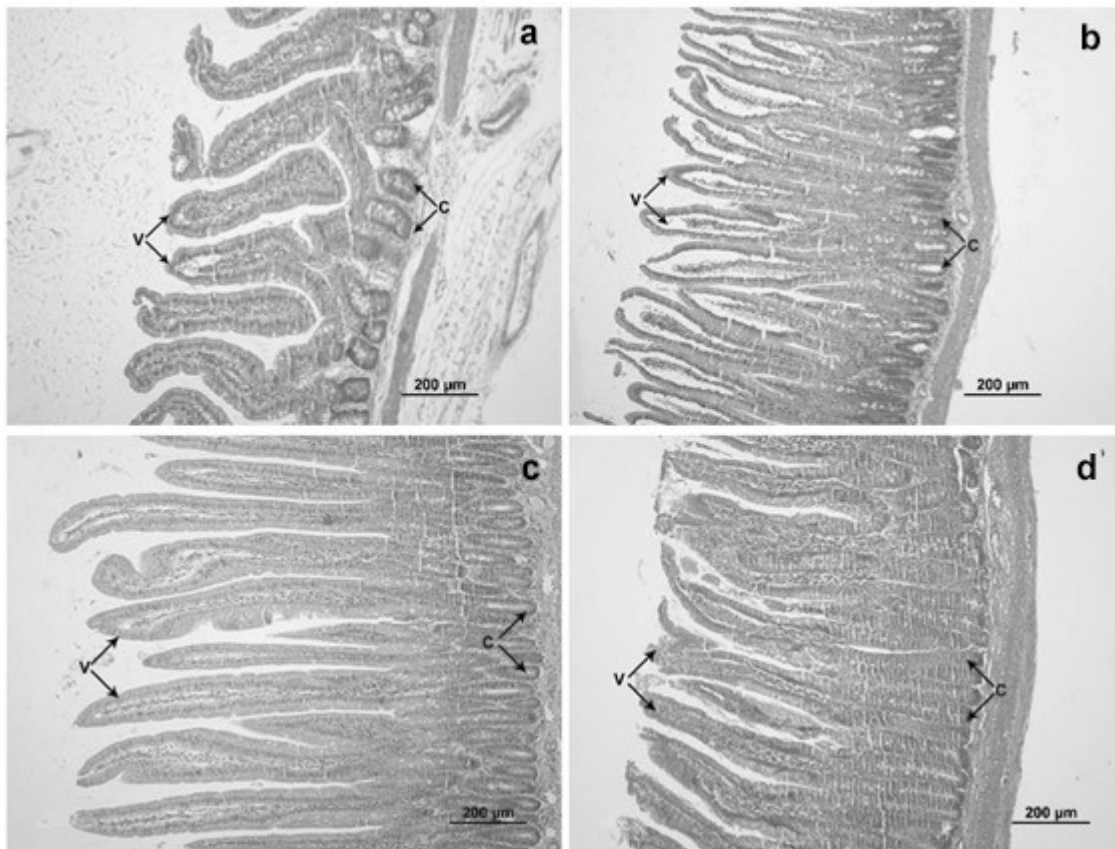


Figure 4: Representative photomicrograph of the duodenal section. (a) - Control Group. (b) - PD Group. (c) - T1DM Group. (d) - T1DM + PD Group. V: villi; C: crypts. Hematoxylin and Eosin (H&E), 4x.

Table 1. Measures of the distance from CEJ to the alveolar crest in all established groups. The values represent the mean \pm standard deviation and are expressed in μm .

Groups	Radiographic Evaluation	Histomorphometric Evaluation
CG	54.16 \pm 2.42 A	105.63 \pm 2.24 A
PD	122.10 \pm 5.61 C	226.52 \pm 6.60 C
T1DM	93.93 \pm 4.06 B	141.38 \pm 19.52 B
T1DM + PD	226.84 \pm 13.40 D	440.09 \pm 6.15 D

Different letters - Statistically significant data ($p < 0.05$)* between groups. ANOVA test and Tukey's post-test

CG Control Group, PD Periodontal Disease, T1DM Type 1 Diabetes Mellitus, T1DM+PD Type 1 Diabetes Mellitus + Periodontal Disease

Table 2. Quantity of osteocytes, osteoblasts, and osteoclasts in all established groups. The values represent the mean \pm standard deviation and are expressed in units.

Groups	Osteoblasts	Osteoclasts	Osteocytes
CG	455.2 \pm 6.48 A	1.1 \pm 0.32 A	462.3 \pm 3.45 A
PD	375.3 \pm 3.97 C	7.6 \pm 0.70 B	374.1 \pm 3.41 C
T1DM	428.0 \pm 2.07 B	1.6 \pm 0.74 A	418.5 \pm 0.76 B
T1DM + PD	198.0 \pm 2.16 D	15.3 \pm 0.96 C	204.0 \pm 3.74 D

Different letters - Statistically significant data ($p < 0.05$)* between groups. ANOVA test and Tukey's post-test

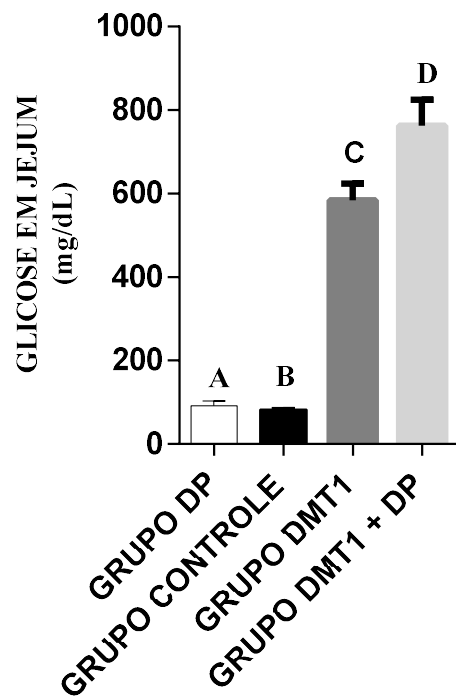
CG Control Group, PD Periodontal Disease, T1DM Type 1 Diabetes Mellitus, T1DM+PD Type 1 Diabetes Mellitus + Periodontal Disease

Table 3. Measurements of villus heights (VH) and crypt heights (CH) in all established groups. The values represent the mean \pm standard deviation and are expressed in μm .

Groups	VH	CH
CG	435.4 \pm 6.44 A	85.3 \pm 5.74 A
PD	447.6 \pm 10.16 B	94.1 \pm 5.34 A
T1DM	711.4 \pm 6.68 C	243.3 \pm 9.16 B
T1DM + PD	945.9 \pm 5.03 D	340.6 \pm 10.63 C

Data not statistically significant ($p > 0.05$)* between groups. ANOVA One-Way Test

CG Control Group, PD Periodontal Disease, T1DM Type 1 Diabetes Mellitus, T1DM+PD Type 1 Diabetes Mellitus + Periodontal Disease



Graphic 1: Fasting glucose values (mg/dL) of animals from all established groups. The values represent the mean \pm standard deviation. Different letters mean that the data are statistically different, with $p < 0.05$. (GraphPad Prism 6)

ANEXO

ANEXO 1 – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA



Autorização

O protocolo intitulado “Avaliação dos tecidos periodontais e da mucosa intestinal inflamatória de ratos com diabetes mellitus tipo 1 e periodontite experimental induzida”, sob a responsabilidade de **Patrícia Oehlmeyer 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 19/10/2018.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/11/2018 - 31/04/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato: <i>Rattus norvegicus</i> , Rato heterogênico Wistar
N. de animais	40
Peso/Idade	100-200g/Adultos
Sexo	Masculino
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Campus Cascavel – PR.

Cascavel, 23/10/2018

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 3730/2016 – GRE

ANEXO 2 – NORMAS DA REVISTA

Inflammation - Submission guidelines Instructions for Authors

1. General

The Council of Biology Editors Style Manual should be used as the style guide for the preparation of manuscripts, particularly with respect to such matters as the use of abbreviations, numbers, and symbols.

Inflammation will not consider studies on the effects of plant extracts on inflammation.

2. Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

3. Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

4. Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

Authorship Policy

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
- Performed research
- Analyzed data
- Contributed new methods or models
- Wrote the paper.

5. Page Charges

The journal makes no page charges. Color can be used without charge for the electronic edition of the journal but will appear in the printed version of the journal at the author's expense. The cost for color reproduction in the printed journal is \$1,150.00 per article, charged to the author.

Title Page

Please use this template title page for providing the following information.

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

6. Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

For life science journals only (when applicable)

Trial registration number and date of registration

Trial registration number, date of registration followed by “retrospectively registered”.

7. Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

8. Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations'.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

To be used for non-life science journals

Funding (information that explains whether and by whom the research was supported)

Conflicts of interest/Competing interests (include appropriate disclosures)

Availability of data and material (data transparency)

Code availability (software application or custom code)

Authors' contributions (optional: please review the submission guidelines from the journal whether statements are mandatory)

To be used for life science journals + articles with biological applications

Funding (information that explains whether and by whom the research was supported)

Conflicts of interest/Competing interests (include appropriate disclosures)

Ethics approval (include appropriate approvals or waivers)

Consent to participate (include appropriate statements)

Consent for publication (include appropriate statements)

Availability of data and material (data transparency)

Code availability (software application or custom code)

Authors' contributions (optional: please review the submission guidelines from the journal whether statements are mandatory)

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

9. Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (Download zip, 188 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

10. Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

11. References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article

Alber, John, Daniel C. O'Connell, and Sabine Kowal. 2002. Personal perspective in TV interviews. *Pragmatics* 12: 257–271.

Article by DOI

Suleiman, Camelia, Daniel C. O'Connell, and Sabine Kowal. 2002. 'If you and I, if we, in this later day, lose that sacred fire...': Perspective in political interviews. *Journal of Psycholinguistic Research*. <https://doi.org/10.1023/A:1015592129296>.

Book

Cameron, Deborah. 1985. *Feminism and linguistic theory*. New York: St. Martin's Press.

Book chapter

Cameron, Deborah. 1997. Theoretical debates in feminist linguistics: Questions of sex and gender. In *Gender and discourse*, ed. Ruth Wodak, 99-119. London: Sage Publications.

Online document

Frisch, Mathias. 2007. Does a low-entropy constraint prevent us from influencing the past? *PhilSci archive*. <http://philsci-archive.pitt.edu/archive/00003390>. Accessed 26 June 2007.

Journal names and book titles should be italicized.

12. Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines.

13. Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

14. Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

15. Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

16. Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

17. Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

18. Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

19. Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

20. Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file. Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

21. Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.

For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

22. Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

23. Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1.

24. Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

25. Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp.

26. Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

27. Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering.

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

28. Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

29. Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk).

30. Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include*:

The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism').

A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').

Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.

Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).

Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.

Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).

Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:

- an erratum/correction may be placed with the article
- an expression of concern may be placed with the article
- or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is maintained on the platform, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author's institution may be informed

A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

31. Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

32. Authorship principles

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

33. Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines*:

All authors whose names appear on the submission

1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;

2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;

3) approved the version to be published; and

4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

* Based on/adapted from:

ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,

Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt et al, PNAS February 27, 2018

Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

34. Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations. Please check the Instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions.

Role of the Corresponding Author

One author is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;

managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;*

providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;

making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

35. Author contributions

Please check the Instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions regarding contribution statements.

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

Examples of such statement(s) are shown below:

- Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Example: CRediT taxonomy:

- Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...]; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For review articles where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the student's dissertation or thesis, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006.

36. Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding

Author, and/or changes in the sequence of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.

- Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

37. Author identification

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

38. Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

39. Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

40. Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

41. Disclosure of potential conflicts of interest

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
 - Honoraria for speaking at symposia
 - Financial support for attending symposia
 - Financial support for educational programs
 - Employment or consultation
 - Support from a project sponsor
 - Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
 - Multiple affiliations
 - Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
 - Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
 - Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work
- In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found [here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Research involving human participants, their data or biological material.

42. Ethics approval

When reporting a study that involved human participants, their data or biological material, authors should include a statement that confirms that the study was approved (or granted exemption) by the appropriate institutional and/or national research ethics committee (including the name of the ethics committee) and certify that the study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that an independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study. If a study was granted exemption from requiring ethics approval, this should also be detailed in the manuscript (including the reasons for the exemption).

43. Retrospective ethics approval

If a study has not been granted ethics committee approval prior to commencing, retrospective ethics approval usually cannot be obtained and it may not be possible to consider the manuscript for peer review. The decision on whether to proceed to peer review in such cases is at the Editor's discretion.

Ethics approval for retrospective studies

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethics approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

44. Ethics approval for case studies

Case reports require ethics approval. Most institutions will have specific policies on this subject. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their institution and seek ethics approval where needed. Authors should be aware to secure informed consent from the individual (or parent or guardian if the participant is a minor or incapable) See also section on Informed Consent.

45. Cell lines

If human cells are used, authors must declare in the manuscript: what cell lines were used by describing the source of the cell line, including when and from where it was obtained, whether the cell line has recently been authenticated and

by what method. If cells were bought from a life science company the following need to be given in the manuscript: name of company (that provided the cells), cell type, number of cell line, and batch of cells.

It is recommended that authors check the NCBI database for misidentification and contamination of human cell lines. This step will alert authors to possible problems with the cell line and may save considerable time and effort.

Further information is available from the International Cell Line Authentication Committee (ICLAC).

Authors should include a statement that confirms that an institutional or independent ethics committee (including the name of the ethics committee) approved the study and that informed consent was obtained from the donor or next of kin.

46. Research Resource Identifiers (RRID)

Research Resource Identifiers (RRID) are persistent unique identifiers (effectively similar to a DOI) for research resources. This journal encourages authors to adopt RRIDs when reporting key biological resources (antibodies, cell lines, model organisms and tools) in their manuscripts.

Examples:

Organism: Filip1tm1a(KOMP)Wtsi RRID:MMRRC_055641-UCD

Cell Line: RST307 cell line RRID:CVCL_C321

Antibody: Luciferase antibody DSHB Cat# LUC-3, RRID:AB_2722109

Plasmid: mRuby3 plasmid RRID:Addgene_104005

Software: ImageJ Version 1.2.4 RRID:SCR_003070

RRIDs are provided by the Resource Identification Portal. Many commonly used research resources already have designated RRIDs. The portal also provides authors links so that they can quickly register a new resource and obtain an RRID.

47. Clinical Trial Registration

The World Health Organization (WHO) definition of a clinical trial is "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes". The WHO defines health interventions as "A health intervention is an act performed for, with or on behalf of a person or population whose purpose is to assess, improve, maintain, promote or modify health, functioning or health conditions" and a health-related outcome is generally defined as a change in the health of a person or population as a result of an intervention.

To ensure the integrity of the reporting of patient-centered trials, authors must register prospective clinical trials (phase II to IV trials) in suitable publicly available repositories. For example www.clinicaltrials.gov or any of the primary registries that participate in the WHO International Clinical Trials Registry Platform.

The trial registration number (TRN) and date of registration should be included as the last line of the manuscript abstract.

For clinical trials that have not been registered prospectively, authors are encouraged to register retrospectively to ensure the complete publication of all results. The trial registration number (TRN), date of registration and the words 'retrospectively registered' should be included as the last line of the manuscript abstract.

Purely observational trials will not require registration.

48. Standards of reporting

Springer Nature advocates complete and transparent reporting of biomedical and biological research and research with biological applications. Authors are recommended to adhere to the minimum reporting guidelines hosted by the EQUATOR Network when preparing their manuscript.

Exact requirements may vary depending on the journal; please refer to the journal's Instructions for Authors.

Checklists are available for a number of study designs, including:

Randomised trials (CONSORT) and Study protocols (SPIRIT)

Observational studies (STROBE)

Systematic reviews and meta-analyses (PRISMA) and protocols (Prisma-P)

Diagnostic/prognostic studies (STARD) and (TRIPOD)

Case reports (CARE)

Clinical practice guidelines (AGREE) and (RIGHT)

Qualitative research (SRQR) and (COREQ)

Animal pre-clinical studies (ARRIVE)

Quality improvement studies (SQUIRE)

Economic evaluations (CHEERS)

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and included on a title page that is separate from the manuscript with a section entitled "Declarations" when submitting a paper. Having all statements in one place allows for a consistent and unified review of the information by the Editor-in-Chief and/or peer reviewers and may speed up the handling of the paper. Declarations include Funding, Conflicts of interest/competing interests, Ethics approval, Consent, Data and/or Code availability and Authors' contribution statements. Please use the following template title page for providing the statements.

Once and if the paper is accepted for publication, the production department will put the respective statements in a distinctly identified section clearly visible for readers.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

- Provide "Ethics approval" as a heading (see template).

49. Examples of ethics approval obtained:

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of A (No. ...).

- This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of University B (Date.../No. ...).
- Approval was obtained from the ethics committee of University C. The procedures used in this study adhere to the tenets of the Declaration of Helsinki.
- The questionnaire and methodology for this study was approved by the Human Research Ethics committee of the University of C (Ethics approval number: ...).

50. Examples of a retrospective study:

- Ethical approval was waived by the local Ethics Committee of University A in view of the retrospective nature of the study and all the procedures being performed were part of the routine care.
- This research study was conducted retrospectively from data obtained for clinical purposes. We consulted extensively with the IRB of XYZ who determined that our study did not need ethical approval. An IRB official waiver of ethical approval was granted from the IRB of XYZ.
- This retrospective chart review study involving human participants was in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The Human Investigation Committee (IRB) of University B approved this study.

Examples no ethical approval required/exemption granted:

- This is an observational study. The XYZ Research Ethics Committee has confirmed that no ethical approval is required.
- The data reproduced from Article X utilized human tissue that was procured via our Biobank AB, which provides de-identified samples. This study was reviewed and deemed exempt by our XYZ Institutional Review Board. The BioBank protocols are in accordance with the ethical standards of our institution and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

51. Informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. This is especially true concerning images of vulnerable people (e.g. minors, patients, refugees, etc) or the use of images in sensitive contexts. In many instances authors will need to secure written consent before including images.

Identifying details (names, dates of birth, identity numbers, biometrical characteristics (such as facial features, fingerprint, writing style, voice pattern, DNA or other distinguishing characteristic) and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scholarly purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases. Detailed descriptions of individual participants, whether of their whole bodies or of body sections, may lead to disclosure of their identity. Under certain circumstances consent is not required as long as information is anonymized and the submission does not include images that may identify the person.

Informed consent for publication should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

52. Exceptions where it is not necessary to obtain consent:

- Images such as x rays, laparoscopic images, ultrasound images, brain scans, pathology slides unless there is a concern about identifying information in which case, authors should ensure that consent is obtained.
- Reuse of images: If images are being reused from prior publications, the Publisher will assume that the prior publication obtained the relevant information regarding consent. Authors should provide the appropriate attribution for republished images.

53. Consent and already available data and/or biologic material

Regardless of whether material is collected from living or dead patients, they (family or guardian if the deceased has not made a pre-mortem decision) must have given prior written consent. The aspect of confidentiality as well as any wishes from the deceased should be respected.

54. Data protection, confidentiality and privacy

When biological material is donated for or data is generated as part of a research project authors should ensure, as part of the informed consent procedure, that the participants are made what kind of (personal) data will be processed, how it will be used and for what purpose. In case of data acquired via a biobank/biorepository, it is possible they apply a broad consent which allows research participants to consent to a broad range of uses of their data and samples which is regarded by research ethics committees as specific enough to be considered "informed". However, authors should always check the specific biobank/biorepository policies or any other type of data provider policies (in case of non-bio research) to be sure that this is the case.

55. Consent to Participate

For all research involving human subjects, freely-given, informed consent to participate in the study must be obtained from participants (or their parent or legal guardian in the case of children under 16) and a statement to this effect should appear in the manuscript. In the case of articles describing human transplantation studies, authors must include a statement declaring that no organs/tissues were obtained from prisoners and must also name the institution(s)/clinic(s)/department(s) via which organs/tissues were obtained. For manuscripts reporting studies involving vulnerable groups where there is the potential for coercion or where consent may not have been fully informed, extra care will be taken by the editor and may be referred to the Springer Nature Research Integrity Group.

56. Consent to Publish

Individuals may consent to participate in a study, but object to having their data published in a journal article. Authors should make sure to also seek consent from individuals to publish their data prior to submitting their paper to a journal. This is in particular applicable to case studies. A consent to publish form can be found [here](#). (Download docx, 36 kB).

57. Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and included on a title page that is separate from the manuscript with a section entitled “Declarations” when submitting a paper. Having all statements in one place allows for a consistent and unified review of the information by the Editor-in-Chief and/or peer reviewers and may speed up the handling of the paper. Declarations include Funding, Conflicts of interest/competing interests, Ethics approval, Consent, Data and/or Code availability and Authors’ contribution statements. Please use the template Title Page for providing the statements.

Once and if the paper is accepted for publication, the production department will put the respective statements in a distinctly identified section clearly visible for readers.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

Provide “Consent to participate” as a heading

Sample statements consent to participate:

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Informed consent was obtained from legal guardians.

Written informed consent was obtained from the parents.

Verbal informed consent was obtained prior to the interview.

The patient has consented to the submission of the case report for submission to the journal.

Provide “Consent to publish” as a heading

The authors affirm that human research participants provided informed consent for publication of the images in Figure(s) 1a, 1b and 1c.

The participant has consented to the submission of the case report to the journal. Patients signed informed consent regarding publishing their data and photographs.

Sample statements if identifying information about participants is available in the article:

Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.

Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Images will be removed from publication if authors have not obtained informed consent or the paper may be removed and replaced with a notice explaining the reason for removal.

58. Research Data Policy

The journal encourages authors, where possible and applicable, to deposit data that support the findings of their research in a public repository. Authors and editors who do not have a preferred repository should consult Springer Nature's list of repositories and research data policy.

List of Repositories.

59. Research Data Policy

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may also be used.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

60. DataCite

Springer Nature provides a research data policy support service for authors and editors, which can be contacted at researchdata@springernature.com.

This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and does not advise on specific manuscripts.

Helpdesk.

61. After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

62. Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

63. Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

64. Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

65. Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

66. Open Choice

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – view the full list

Benefits:

- Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.
- Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average*.
- Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

Open Choice

Funding and Support pages

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Find more about the license agreement

English Language Editing

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

- Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.
- Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.
- Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a

10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.

English language tutorial

Nature Research Editing Service.

67. American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.