



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOMEDICINA**



SOLANGE AVYLLA SANTOS MARTINS CARVALHO

**EFEITOS LOCAIS E SISTÊMICOS DA DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA)
EM RATOS APÓS PERIODONTITE INDUZIDA**

PARNAÍBA – PI

2022

SOLANGE AVYLLA SANTOS MARTINS CARVALHO

**EFEITOS LOCAIS E SISTÊMICOS DA DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA)
EM RATOS APÓS PERIODONTITE INDUZIDA**

Trabalho de Conclusão do Curso de Bacharelado em Biomedicina apresentado na Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr, como requisito para obtenção do título de Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Dias de Souza Filho

PARNAÍBA – PI

2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do Parnaíba
Biblioteca Central Prof. Cândido Athayde
Serviço de Processamento Técnico

C331e Carvalho, Solange Avylla Santos Martins

Efeitos locais e sistêmicos da dehidroepiandrosterona (DHEA) em ratos após periodontite induzida [recurso eletrônico] Solange Avylla Santos Martins. – 2022.

1 Arquivo em PDF.

TCC (Bacharelado em Biomedicina) – Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 2022.

Orientação: Prof. Dr. Manoel Dias de Souza Filho

1. Periodontite. 2. Dehidroepiandrosterona. 3. DHEA. 4. Estresse Oxidativo. 5. Inflamação. I. Título.

CDD: 617.632

SOLANGE AVYLLA SANTOS MARTINS CARVALHO

**EFEITOS LOCAIS E SISTÊMICOS DA DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA)
EM RATOS APÓS PERIODONTITE INDUZIDA**

Trabalho de Conclusão do Curso de Bacharelado em Biomedicina apresentado na Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr, como requisito para obtenção do título de Biomédica.

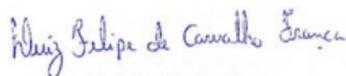
Orientador: Prof. Dr. Manoel Dias de Souza Filho

APROVADA EM: 28/03/2023

BANCA EXAMINADORA:



Even Herllany Pereira Alves



Luiz Felipe Carvalho França



Manoel Dias de Souza Filho
Orientador

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem ilustrativa de um dente saudável e um dente com periodontite. . .	13
Figura 2. Histologia do útero de rata.	15
Figura 3. Imagem histológica demonstrando a presença de uma veia central (VC) e hepatócitos (H).	16
Figura 4. Gráfico demonstrando a redução na produção de hormônios nas mulheres.	17
Figura 5. Efeitos da dehidroepiandrosterona em vários tecidos e órgãos baseado nas informações da literatura.	19
Figura 6. Diferença do IPB nos grupos 2, 3 e 4 em relação ao grupo controle.	29
Figura 7. Diferença do IPB nos grupos 2, 3 e 4 em relação ao grupo controle.	30
Figura 8. Resultados para Soma AOA total.	31
Figura 9. Gráfico da diferença entre os níveis de MPO do tecido gengival.	32
Figura 10. Resultado para MPO do fígado entre os grupos 1, 2 e 3.	33
Figura 11. Gráfico da diferença entre os níveis de MPO do tecido uterino entre os grupos 1, 2 e 3.	34
Figura 12. Avaliação histopatológica do fígado dos grupos.	35
Figura 13. Representação do tecido uterino dos grupos analisados.	37

RESUMO

A dehidroepiandrosterona (DHEA) é o hormônio esteroide mais abundante no corpo humano e está associada à produção dos hormônios estrogênio e testosterona. Esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos locais e sistêmicos da dehidroepiandrosterona (DHEA) em ratas ovariectomizadas com periodontite induzida. A metodologia do estudo consistiu em realizar ovariectomia em ratas e posteriormente induzir a periodontite, feito isso foram administradas diferentes formulações por um período de 20 dias. Passado este período foi feita a análise dos parâmetros clínicos orais, altura óssea alveolar e presença da enzima mieloperoxidase no tecido gengival e avaliar os tecidos hepáticos e uterino foi realizado a dosagem da enzima mieloperoxidase e avaliação histopatológica. A periodontite induzida por ligadura causou alterações clínicas e morfométricas no tecido periodontal, comprovado pelo aumento da perda óssea alveolar, dos índices de sangramento gengival e profundidade da bolsa. O tratamento de animais com DHEA não foi capaz de reduzir os parâmetros inflamatórios orais e perda óssea alveolar característica da doença. Além disso, o estudo demonstra que a periodontite pode induzir inflamação uterina em animais ovariectomizados, considerando que o grupo de animais ovariectomizados e com periodontite induzida apresentou significativo estresse oxidativo no tecido uterino e histologia compatível com processo inflamatório. Foi possível observar um efeito positivo da suplementação de DHEA sobre o tecido hepático dos animais ovariectomizados com periodontite. Houve uma preservação da estrutura dos hepatócitos e dos espaços sinusoides nos grupos suplementados, o que não foi observado no grupo sem suplementação. O tratamento de animais com DHEA não foi capaz de reduzir os parâmetros inflamatórios orais e perda óssea alveolar característica da doença. Portanto, apesar de não ter uma ação protetora no tecido gengival, podendo até acentuar o estresse oxidativo decorrente da ovariectomia, da indução da periodontite ou da associação de ambos, a administração de DHEA pode ter protegido o tecido uterino contra a ação da inflamação na dose de 25 mg/kg, considerando a análise da mieloperoxidase e da histologia do tecido uterino. Além disso, o estudo demonstra que a periodontite pode induzir inflamação uterina em animais ovariectomizados, considerando que o grupo de animais ovariectomizados e com periodontite induzida apresentou significativo estresse oxidativo no tecido uterino e histologia compatível com processo inflamatório. Ademais, foi possível observar um efeito positivo da suplementação de DHEA sobre o tecido hepático dos animais ovariectomizados com periodontite.

Palavras-chave: Dehidroepiandrosterona, Estresse oxidativo, Inflamação, Periodontite.

ABSTRACT

Periodontitis is a bacterial inflammatory disease characterized by connective tissue rupture, loss of attachment of ligaments and resorption of alveolar bone, which may lead to tooth loss. Dehydroepiandrosterone (DHEA) is the most abundant steroid hormone in the human body and is associated with the production of the hormones estrogen and testosterone. This study aimed to investigate the local and systemic effects of dehydroepiandrosterone supplementation on periodontitis in ovariectomized rats submitted to a model of induction of periodontitis by ligature. The study methodology consisted of performing ovariectomy on the rats and subsequently inducing periodontitis, after which the pharmaceutical solutions proposed in the work were administered for a period of 20 days. After the experimental days, the analysis of the oral clinical parameters, alveolar bone height and the presence of the myeloperoxidase enzyme in the gingival tissue was carried out. To evaluate the hepatic and uterine tissues, the dosage of the myeloperoxidase enzyme and histopathological evaluation were performed. Ligature-induced periodontitis caused clinical and morphometric changes in periodontal tissue, as evidenced by increased alveolar bone loss, gingival bleeding rates and pocket depth. The treatment of animals with DHEA was not able to reduce the oral inflammatory parameters and alveolar bone loss characteristic of the disease. In addition, the study demonstrates that periodontitis can induce uterine inflammation in ovariectomized animals, considering that the group of ovariectomized animals with induced periodontitis showed significant oxidative stress in the uterine tissue and histology compatible with an inflammatory process. It was possible to observe a positive effect of DHEA supplementation on the liver tissue of ovariectomized animals with periodontitis. There was preservation of the structure of hepatocytes and sinusoid spaces in the supplemented groups, which was not observed in the group without supplementation. The treatment of animals with DHEA was not able to reduce the oral inflammatory parameters and alveolar bone loss characteristic of the disease. Therefore, new experiments with different doses of DHEA are necessary to evaluate the effects of supplementation of the substance in relation to periodontitis. Although it does not have a protective action on the gingival tissue, and may even accentuate the oxidative stress resulting from the ovariectomy, the induction of periodontitis or the combination of both, it may have protected the uterine tissue against the action of inflammation at a dose of 25 mg/kg, considering the myeloperoxidase analysis and the histology of the uterine tissue. In addition, the study demonstrates that periodontitis can induce uterine inflammation in ovariectomized animals, considering that the group of ovariectomized animals with induced periodontitis showed significant oxidative stress in the uterine tissue and histology compatible with an inflammatory process. It was possible to observe a positive effect of DHEA supplementation on the liver tissue of ovariectomized animals with periodontitis.

Keywords: Dehydroepiandrosterone, Oxidative stress, Inflammation, Periodontitis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Periodontite	12
2.2 Periodontite e o Estresse Oxidativo	13
2.3 Estrutura do Tecido Uterino	14
2.4 Estrutura do Tecido Hepático.....	15
2.5 Menopausa	16
2.6 DHEA	17
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4 METODOLOGIA	21
4.1. Caracterização da pesquisa.....	21
4.2 Critérios éticos	21
4.3 Animais	21
4.4 Substâncias utilizadas no experimento.....	21
4.4.1 DHEA	21
4.4.2 Solução salina	22
4.4.3 Anestesia	22
4.5 Desenho Experimental.....	22
4.5.1 Caracterização dos grupos.....	22
4.5.1.1 Avaliação da ação da DHEA nos parâmetros periodontais.....	22
4.5.1.2 Avaliação da ação da DHEA nos tecidos gengivais, hepáticos e útero .	23
4.5.2 Modelo de Indução da Periodontite	24
4.5.3 Modelo de ovariectomia das ratas.....	24
4.5.4 Administração das fórmulas farmacêuticas	24
4.6 Avaliação dos parâmetros inflamatórios	24
4.6.1 Índice Gengival	24
4.6.2 Avaliação da mobilidade dentária.....	24
4.6.3 Índice de profundidade de sondagem	25
4.6.4 Análise morfométrica da altura óssea alveolar	25

4.7 Avaliação de atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO).....	26
4.8 Histologia dos tecidos hepático e uterino.....	26
4.9 Análise Estatística.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Avaliação dos parâmetros periodontais	28
5.2 MPO dos tecidos gengivias, hepáticos e úteros	31
5.3 Histologia dos tecidos hepático e uterino.....	34
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS.....	39
ANEXOS	44

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória bacteriana caracterizada pela ruptura do tecido conjuntivo, pela perda da inserção dos ligamentos e reabsorção do osso alveolar, podendo levar a perda do dente. O biofilme bacteriano é o fator etiológico primário na periodontite, aderindo-se à superfície dentária desencadeando uma reação inflamatória intensa, degradando a matriz extracelular ocasionando a reabsorção do osso alveolar, conduzindo a uma perda irreversível da inserção do tecido periodontal (HUANG et al., 2020).

Estudos recentes apontam que a periodontite causa danos além da região oral, atingindo outros órgãos, como o fígado, onde foi relacionada com a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (CARVAHO et al., 2017), apresentando hepatócitos com esteatose microvesicular, perda da organização tecidual, congestão dos vasos sinusoides, hepatócitos binucleados e altos níveis de fosfatase. Um dos mecanismos associados a esse efeito sistêmico é o estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2019). Outros órgãos também podem sofrer efeitos sistêmicos como os rins (FRANÇA et al., 2017) e o coração (SANZ et al., 2020). No entanto, outras variáveis biológicas podem interferir na prevalência e gravidade da periodontite, entre essas está o desequilíbrio na produção e liberação dos hormônios sexuais (MEDEIROS; MAITELLI; NINCE, 2007).

A dehidroepiandrosterona (DHEA) é o hormônio esteroide mais abundante no corpo humano e está associada à produção dos hormônios estrogênio e testosterona (VILLAREAL et al., 2000). Um inevitável desequilíbrio na produção desses hormônios pode desencadear a menopausa por exemplo. Nessa condição, há diminuição da concentração desses hormônios, o que acarreta em impactos negativos na mucosa vaginal e, também, na mucosa oral, visto que ambos os tecidos têm receptores para esses hormônios (MEDEIROS; MAITELLI; NINCE, 2007)

Os hormônios esteróides sexuais, para além das suas funções específicas, são também responsáveis pela saúde periodontal, pela manutenção da arquitetura do periodonto e seus constituintes, nomeadamente: gengiva, cemento, ligamento periodontal e osso alveolar. Essas hormonas têm a capacidade de poder originar mudanças ao nível dos mediadores inflamatórios, crescimento e diferenciação de fibroblastos e permeabilidade vascular. Osteoblastos e fibroblastos presentes no

tecido periodontal, afetam a saúde do periodonto através da resposta dos seus recetores de estrogénio aos diferentes níveis de hormonas, nos diferentes estadios da vida reprodutiva (BERTULUCCI et al., 2012; SURI & SURI, 2014).

Outras consequências da diminuição do estrôgeno é tornar as células da mucosa oral mais susceptíveis a danos motores locais e mais vulneráveis a infecções. Mudanças na secreção e consistência da saliva também são consequência dessa diminuição. Assim, em mulheres na menopausa, há um risco aumentado para o desenvolvimento de cáries e doenças (CIESIELSKA et al., 2021). Na periodontite, a inflamação é protagonizada por neutrófilos, onde as citocinas pró-inflamatórias liberadas caem na corrente sanguínea e, somado ao estresse oxidativo resultante da resposta inflamatória ao biofilme, causam danos sistêmicos. Ademais, estudos mostram que, no período da menopausa, a osteoporose está fortemente associada ao risco de desenvolver periodontite, principalmente nos quatro primeiros anos após o início da menopausa. A diminuição dos níveis de estrôgeno, derivado do DHEA, impulsiona a formação de citocinas de reabsorção óssea, como RANKL, TNF- α e interleucina 1, que contribuem para o enfraquecimento ósseo (LEE, 2022).

Sendo assim, a suplementação com DHEA promove ação sobre o metabolismo celular e é capaz de aumentar os níveis plasmáticos de androstenediona, testosterona, estradiol e estrona em homens e mulheres promovendo uma melhora significativa nos parâmetros endócrinos, metabólicos e psicológicos dos indivíduos que fazem o uso desse hormônio (MEDEIROS; MAITELLI; NINCE, 2007). Essa suplementação com DHEA é realizada por algumas mulheres na menopausa como método auxiliar na adequação dos níveis de hormônios sexuais (LI et al., 2020), mas as consequências hepáticas e de outros órgãos dessa estratégia ainda não foi avaliada em mulheres na menopausa com doenças periodontais.

Assim, diante das descobertas das diferentes ações farmacológicas da DHEA, da estratégia de algumas mulheres na menopausa de utilizarem a suplementação dessa substância para auxiliar na regulação dos hormônios sexuais, das características da periodontite como doença inflamatória capaz de causar efeitos sistêmicos e das variações hormonais que ocorre em mulheres no período da menopausa, o presente estudo investigou os efeitos locais e sistêmicos da suplementação com dehidroepiandrosterona em ratas ovariectomizadas e submetidas a um modelo de indução da periodontite por ligadura.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

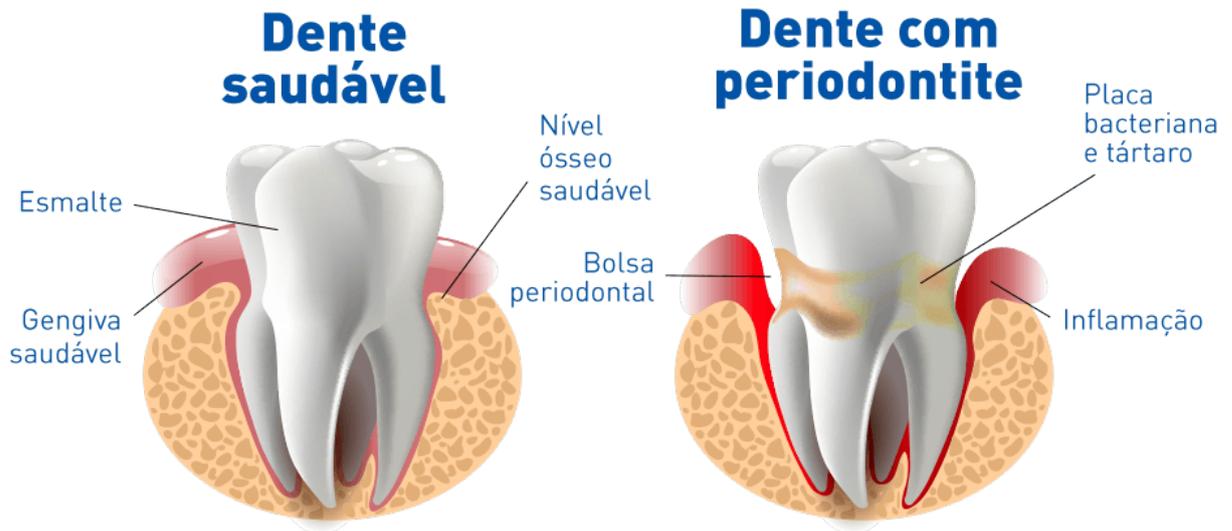
2.1 Periodontite

As doenças periodontais afetam cerca de 538 milhões de adultos em todo o mundo (KASSEBAUM et al., 2017). Especificamente, a periodontite, uma das principais doenças periodontais, a mesma pode causar destruição do ligamento periodontal, osso alveolar ao redor dos dentes e, ocasionalmente, pode favorecer a perda dentária (ARMINGOHAR et al., 2014) (Figura 1). Em diferentes regiões do mundo varia significativamente uma elevada prevalência de periodontite, onde nos EUA atinge cerca de 50% da população; na América do Sul, inclusive no Brasil, existe pouca informação devido uma grande carência de estudos com uma adequada metodologia (TEIXEIRA, et al., 2019).

O fator etiológico primário na periodontite é o biofilme polimicrobiano formado nas superfícies dos dentes denominado placa bacteriana (KAMBALYAL et al., 2015). No entanto, outras variáveis biológicas podem interferir na prevalência e gravidade da doença periodontal, entre essas está o desequilíbrio na produção e liberação dos hormônios sexuais (ZULKEPLE, et al., 2016; SURI; SURI, 2014). O eixo hipófise-adrenal (HPA) responde à ação induzida por estressores, fazendo com que o hipotálamo secrete corticotropina. Em resposta, a hipófise libera hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), estimulando o córtex adrenal liberando glicocorticoides (FLIER et al., 1995).

Os glicocorticoides agem em locais inflamatórios reduzindo o número de células do sistema imune, inibindo a produção de citocinas e o acúmulo de macrófagos (SCANNAPIECO; GERSHOVICH, 2020). O cortisol, principal glicocorticoide, é conhecido como um biomarcador de estresse, podendo desempenhar um papel importante na patogênese da periodontite, desempenhando um efeito inibitório nas respostas imunes (DUBAR, M. et al., 2020).

Figura 1. Imagem ilustrativa de um dente saudável apresentando os tecidos periodontais íntegros e um dente com periodontite, demonstrando a presença do biofilme, formação de bolsa periodontal e perda óssea alveolar.



Fonte: www.semprebem.com.br

2.2 Periodontite e o Estresse Oxidativo

A periodontite é uma doença inflamatória que afeta os tecidos de suporte dos dentes, como a gengiva, o ligamento periodontal, cemento e o osso alveolar, causando-lhes destruição decorrente de uma infecção bacteriana somada a uma resposta inflamatória intensa que pode ter influência na saúde sistêmica (WANG, ANDRUKHOV; RAUSCH-FAN, 2017). Muitos estudos associam a periodontite a outras doenças sistêmicas e a consideram como fator de risco para algumas moléstias cardiovasculares, respiratórias, endócrinas, musculoesqueléticas e relacionadas ao sistema reprodutor (ARIGBEDE, BABATOPE & BAMIDELE, 2012).

Sugere-se que a carga bacteriana da doença periodontal é a contribuição da periodontite para outras complicações sistêmicas, considerando que a intensa resposta inflamatória contribui para a fisiopatologia dessas complicações (GENCO & SANZ, 2020). Essa intensa resposta inflamatória é mediada por células, como neutrófilos e macrófagos, que aumentam a produção de EROs como mecanismo de combate aos patógenos invasores. Essas EROs, em condições normais, são utilizadas como mecanismo de defesa do organismo, mas, quando produzidas em excesso, podem causar dano tecidual direto envolvendo a peroxidação de lipídeos, danos no DNA, nas proteínas e a oxidação de importantes enzimas.

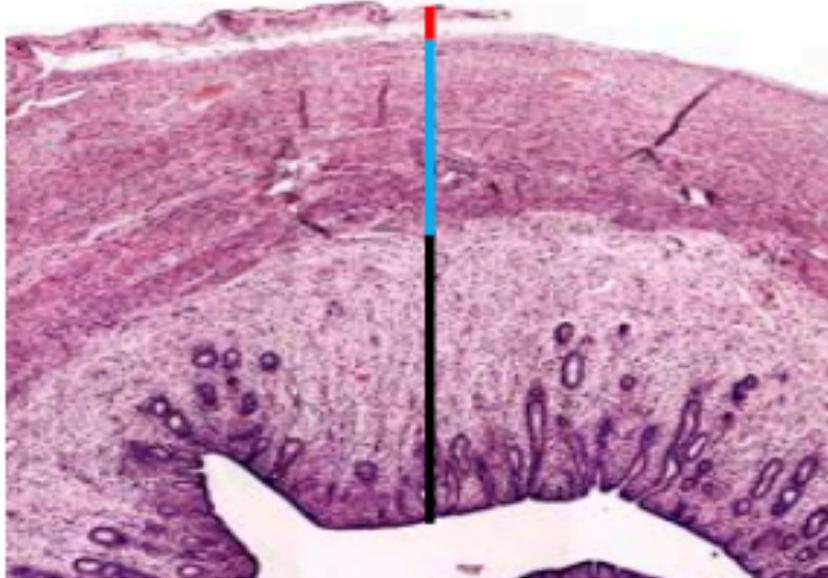
Naturalmente, há um sistema antioxidante que equilibra a ação das EROs, composto por superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) entre outras, impedindo os danos supracitados, porém, esse sistema não impede os danos caso exista uma superprodução de EROs, como na periodontite. Vários estudos, além de associar o aumento da produção de EROs à periodontite, também verificaram uma diminuição da atividade de substâncias antioxidantes, como SOD e CAT, nessa doença (WANG, ANDRUKHOV; RAUSCH-FAN, 2017). Em pormenores, os neutrófilos, a primeira linha de defesa celular contra o biofilme bacteriano, tornam-se abundante nos tecidos gengival e periodontal, tornando-se a principal fonte de EROs nessa doença. Essa produção de EROs é decorrente de uma via metabólica denominada de burst oxidativo durante a fagocitose.

Estudos também sugerem que pessoas com periodontite possuem neutrófilos com um fenótipo hiper-reativo e que, mesmo sem estímulos, esses neutrófilos liberam mais EROs que os neutrófilos de pacientes saudáveis, assim, contribuindo para patologias sistêmicas (WANG, ANDRUKHOV & RAUSCH-FAN, 2017).

2.3 Estrutura do Tecido Uterino

O útero é um órgão muscular, oco e com três camadas distintas: uma camada externa de tecido conjuntivo e mesotélio (camada serosa), uma camada de músculo liso interna (miométrio) e uma camada mucosa (endométrio) (Figura 2). O miométrio é a camada mais espessa e é composto por fibras de músculo liso dispostas em quatro camadas, com a presença de grandes vasos sanguíneos. O endométrio é composto por um tecido epitelial de revestimento e uma lâmina própria que contém glândulas tubulares simples. O epitélio das glândulas é composto de células colunares simples com células secretoras. A lâmina própria é rica em fibroblastos e matriz extracelular (FERNANDES et al., 2019).

Figura 2. Histologia do útero de rata. Corado com HE. Linha preta: endométrio. Linha azul: miométrio. Linha vermelha: camada serosa.

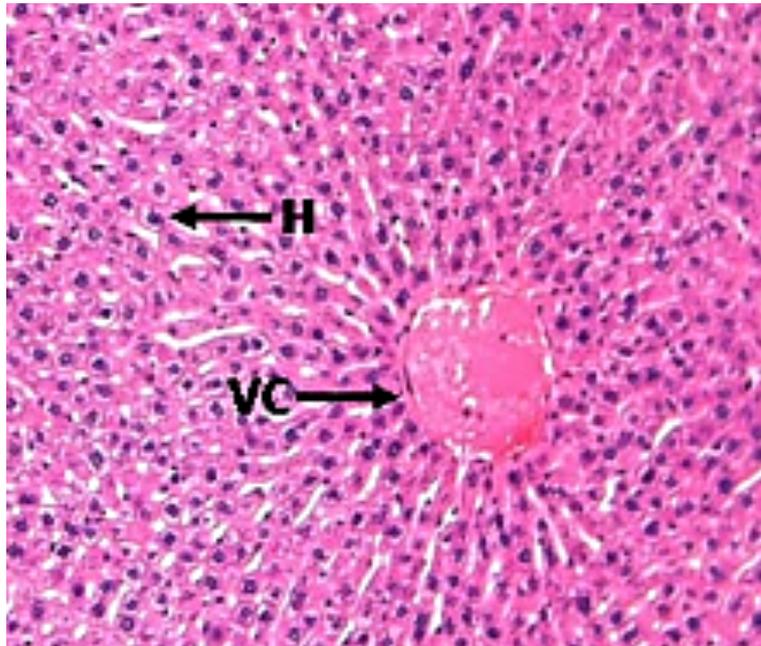


Fonte: Histologia UNB, com adaptações.

2.4 Estrutura do Tecido Hepático

O tecido hepático é revestido por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo denso não modelado, cápsula de Glisson, recoberto pelo peritônio. O tecido conjuntivo da cápsula estende-se para o interior do parênquima hepático, onde se observa unidades estruturais chamadas lóbulos hepáticos. Compostos também por células não parenquimatosas como: células de Kupffer, células endoteliais e células estreladas hepáticas que desempenham funções hepáticas em colaboração com os hepatócitos (Figura 3). O espaço entre células não parenquimatosas do fígado e os hepatócitos é preenchido com um material rico em proteínas chamado Espaço de Disse. Este espaço desempenha um papel importante na função hepática através da regulação da troca de materiais e nutrientes entre as células endoteliais e os hepatócitos. No nível celular, a tríade portal consiste em ramos terminais adjacentes e paralelos de ductos biliares, vênulas portais e arteríolas hepáticas que margeiam os hepatócitos (HOSSEINI et al., 2019).

Figura 3. Imagem histológica demonstrando a presença de uma veia central (VC) e hepatócitos (H).

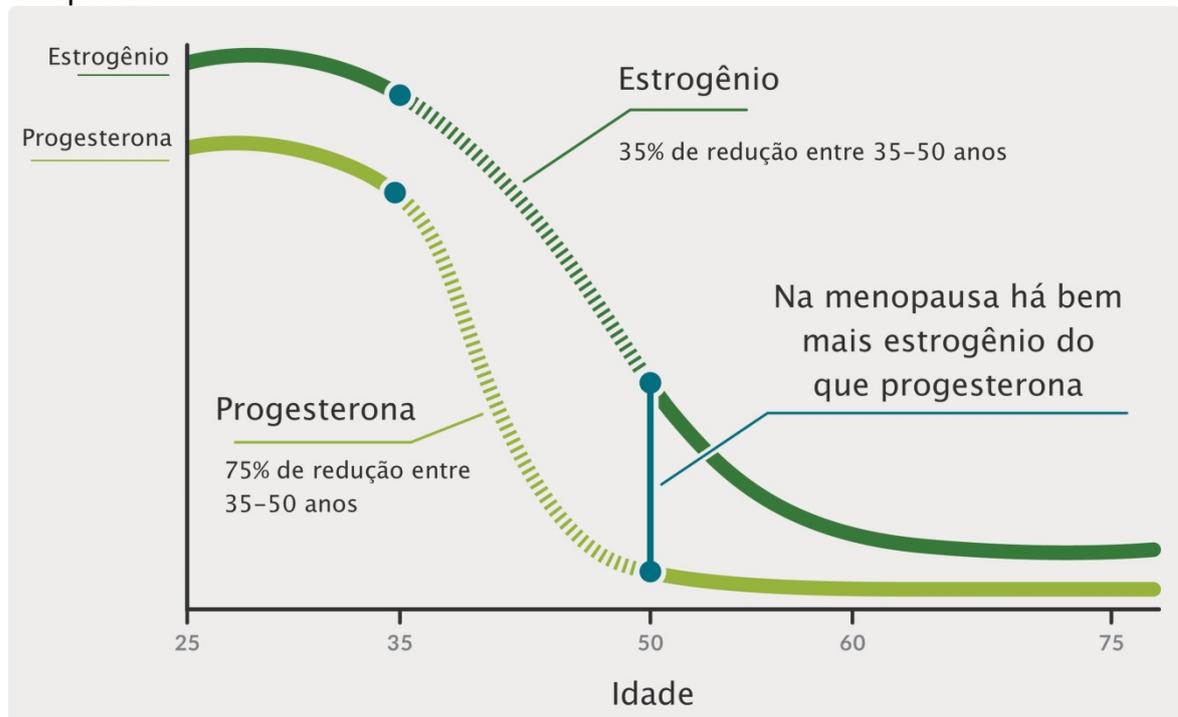


Fonte: ALOIA, 2010.

2.5 Menopausa

A menopausa provoca mudanças biológicas e endócrinas nas mulheres, associadas, principalmente, à produção de hormônios sexuais (Figura 4). Nesse período, ocorre significativa redução de hormônios, como o estrógeno e a progesterona, podendo ser um fator agravante para o desenvolvimento da periodontite, pois as variações nos níveis hormonais afetam diretamente a cavidade oral, pelo fato da mucosa oral conter receptores desses hormônios (ZULKEPLE, et al., 2016; SURI; SURI, 2014). Ademais, os níveis de testosterona, hormônio também produzido por mulheres, estão diretamente relacionados ao metabolismo ósseo no processo inflamatório, e podem influenciar diretamente nas alterações ósseas causadas pela periodontite (HUBER et al., 2001; MICHAEL et al., 2005).

Figura 4. Gráfico demonstrando a redução na produção de hormônios nas mulheres como a progesterona e estrogênio, a partir dos 35 anos, agravando-se na menopausa.



Fonte: www.andreiatorres.com.br

2.6 DHEA

A dehidroepiandrosterona (DHEA) é o hormônio esteroidal mais abundante no corpo humano e está diretamente associado à produção de estrogênio e testosterona (VILLAREAL et al., 2000). É o principal precursor dos hormônios androgênicos, sendo produzido nos ovários, adrenal e derivada do sulfato de dehidroepiandrosterona (S-DHEA) sanguíneo. A DHEA, na pós-menopausa, apresenta queda de 60%, podendo causar comprometimento dos ossos, cérebro, vagina, e no metabolismo de lipídios, insulina e glicose (LABRIE et al., 2005).

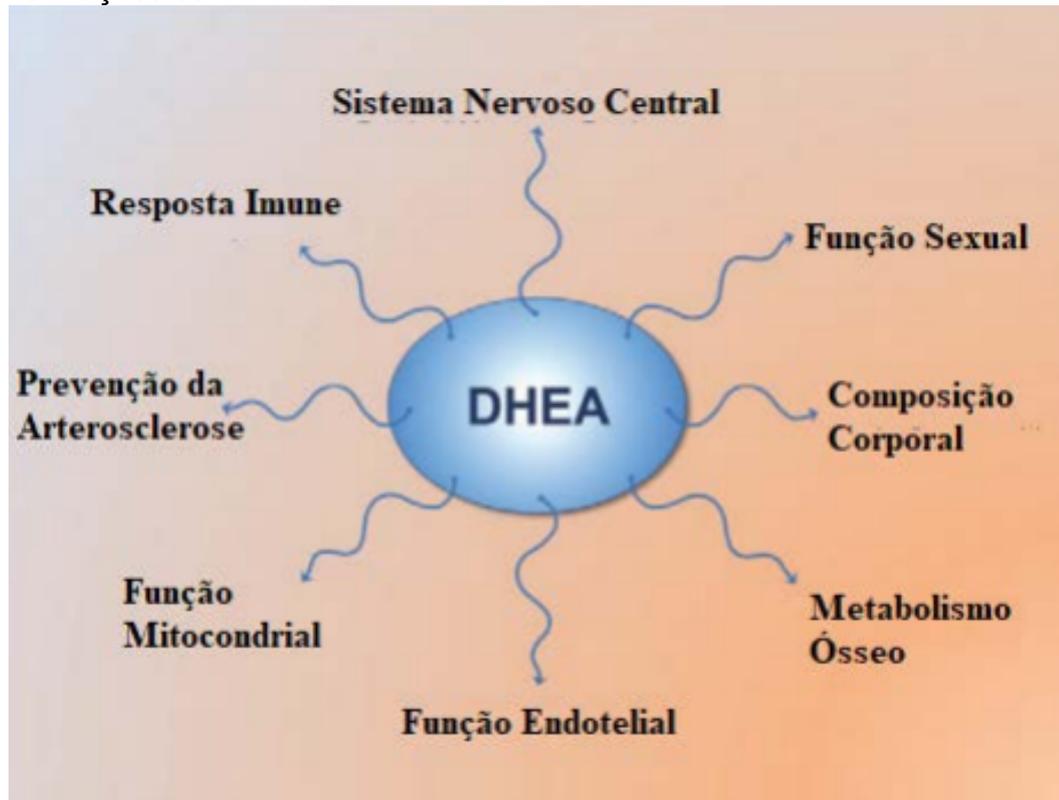
Mais especificamente, a suplementação com DHEA promove ação sobre o metabolismo celular, e é capaz de aumentar os níveis plasmáticos de androstenediona, testosterona, estradiol e estrona em homens e mulheres, promovendo dessa forma melhora significativa nos parâmetros endócrinos, metabólicos e psicológicos nos indivíduos que fazem uso da suplementação com esse hormônio (GENAZZANI et al., 2001).

Bhawna et al. (2013) selecionaram 100 pacientes que foram submetidas a remoção do útero, colo do útero, tubas uterinas e ovários, independente da faixa etária e indicação de cirurgia. Entre as participantes, 25 mulheres receberam doses

diárias de DHEA durante 12 meses e foi observado redução significativa na ocorrência de sintomas vasomotores, psicológicos, sexuais e geniturinários comuns no climatério. Ke et al. (2015) e Labrie et al. (2016) estudaram os níveis séricos de esteróides e metabólitos sexuais após 12 semanas de administração intravaginal de DHEA em 325 mulheres na pós-menopausa, com concentrações séricas de esteroides dentro dos valores normais, mas que apresentavam dor na atividade sexual como sintoma associado à atrofia vulvovaginal.

Os dados obtidos nesse estudo confirmam que a DHEA pode ser convertida intracelularmente em estrogênios e andrógenos com ação restrita ao sítio de administração do hormônio, sem liberação significativa na circulação, evitando prováveis efeitos sistêmicos. O presente estudo mostrou também efeitos positivos sobre as células parabasais, percentagem de células superficiais, pH vaginal e diminuição na dor durante a atividade sexual, bem como redução da secura vaginal das mulheres tratadas com DHEA. Labrie et al. (2016) ainda confirmaram parte dos resultados descritos acima ao estudarem os efeitos sistêmicos da administração diária, via intravaginal, de baixas doses de DHEA em 40 mulheres, com idade entre 53 e 69 anos, que sofriam de sintomas de moderado a grave de atrofia vaginal na pós-menopausa. O estudo mostrou que não ocorreram variações significativas nos níveis séricos de estradiol, testosterona, DHEA ou de seus metabólitos, confirmando, assim, a ação localizada da droga e a segurança desse protocolo de tratamento.

Figura 5. Efeitos da dehidroepiandrosterona em vários tecidos e órgãos baseado nas informações da literatura.



Fonte: Modificado de TRAISH et al., 2011.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os feitos locais e sistêmicos da dehidroepiandrosterona (DHEA) em ratas ovariectomizadas com periodontite induzida.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre os parâmetros clínicos inflamatórios periodontais: índice gengival, índice de profundidade de sondagem e mobilidade dentária no modelo de periodontite induzida;
- Analisar os efeitos da dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre a reabsorção óssea por meio da histomorfometria;
- Realizar a dosagem da Enzima Mieloperoxidase nos tecidos gengivais, hepáticos e uterinos;
- Avaliar o fígado dos animais por meio de parâmetros histológicos;
- Avaliar o útero dos animais por meio de parâmetros histológicos.

4 METODOLOGIA

4.1. Caracterização da pesquisa

Trata-se de um estudo analítico experimental sobre os efeitos da suplementação com DHEA de ratas da variedade Wistar (*Rattus norvegicus*) ovariectomizadas sobre as características clínico-patológicas de seus tecidos periodontais, hepáticos e uteros, após serem submetidas a um modelo de indução da periodontite.

4.2 Critérios éticos

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Delta do Parnaíba, nº do registro 004/19, Campus Ministro Reis Velloso, em Parnaíba-PI. Todos os tratamentos e procedimentos realizados nos animais estavam de acordo com a lei Nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, com as normas internacionais do uso de animais em pesquisa científica e com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), além de respeitar a legislação vigente com relação à eutanásia de animais descrita na Normativa Nº 37, CONCEA, 2018.

4.3 Animais

Foram utilizados animais com mais de 3 meses de idade obtidos no Biotério Geral da Universidade Federal do Delta do Parnaíba, pesando entre 200 ± 260 g. Esses animais foram mantidos sob condições padronizadas (ciclos de claro e escuro de 12 horas, à temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e com livre acesso à água e alimentos - ad libitum) em ambiente reservado e destinado ao experimento com animais do Núcleo de Pesquisa Pós-graduação do Campus Universitário Ministro Reis Velloso garantindo, assim, as boas práticas de experimentação em animais.

4.4 Substâncias utilizadas no experimento

4.4.1 DHEA

A DHEA (Life Extension - Estados Unidos da América) foi administrada via gavagem (administração orogástrica), de acordo com a seleção prévia dos grupos de ratos. Para isso, foi realizada a técnica de contenção mecânica manual preconizada para ratos. Cada animal foi contido firmemente, porém de forma gentil,

colocando-se a mão sobre o dorso e a caixa torácica e a cabeça segura com o polegar e o indicador, imediatamente atrás da mandíbula, como recomendado pela Fundação Osvaldo Cruz (BRASIL, 2005). Foram tomados todos os cuidados necessários para evitar o estresse e sofrimento dos animais durante esse procedimento. Após a contenção do animal, uma cânula rígida de aço inoxidável com extremidade arredondada foi cuidadosamente introduzida na boca do animal, passando pelo esôfago e chegando ao estômago, onde a dose de DHEA foi dispensada. O volume máximo dado por gavagem foi de 10mL/kg de peso corpóreo do animal (BRASIL, 2016).

4.4.2 Solução salina

Uma solução salina de Cloreto de Sódio 0,9% - Solução fisiológica (Eurofarma-Brasil) foi utilizada como veículo. A solução de Cloreto de Sódio 0,9% é utilizada para o restabelecimento de fluido e eletrólitos, como repositora de água e eletrólitos em caso de alcalose metabólica de grau moderado, em carência de sódio e como diluente para medicamentos. E nesse caso, não possui nenhum efeito sobre a periodontite quando usada por via oral por gavagem (administração orogástrica).

4.4.3 Anestesia

Nos modelos de indução da periodontite, orquiectomia ou ovariectomia, cada animal foi anestesiado previamente por meio da associação de Cloridrato de Cetamina (80mg/kg, i.p.; Francotar, Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda., Brasil) e Cloridrato de Xilazina (10mg/kg, i.p.; Kensol, Konig S.A., Brasil), seguindo os experimentos conduzidos por Campi et al., 2016 e respeitando a dose limite preconizada pela RN 33, CONCEA, 2016. Nessa etapa do experimento, também foi realizada a técnica de contenção mecânica manual preconizada para ratos, explicada acima (BRASIL, 2005).

4.5 Desenho Experimental

4.5.1 Caracterização dos grupos

4.5.1.1 Avaliação da ação da DHEA nos parâmetros periodontais

Inicialmente, foram investigados efeitos periodontais do DHEA na dose de 50mg/Kg. Assim, as ratas foram distribuídas de forma randomizada em 3 grupos de

6 animais. Todos os animais receberam doses diárias das suas respectivas substâncias, durante 20 dias. De forma mais detalhada, os grupos apresentaram as seguintes características:

- Grupo 1: formado por ratas ovariectomizadas que receberam a administração de 2mL de solução fisiológica à 0,9%, via oral (Grupo ovariectomizada salina; Grupo OS);
- Grupo 2: formado por ratas ovariectomizadas e que foram submetidas à indução da periodontite, além de receber a administração de 2mL de solução fisiológica à 0,9%, via oral (Grupo periodontite ovariectomizada salina; Grupo POS);
- Grupo 3: constituído por ratas ovariectomizadas que receberam doses de 50mg/Kg de DHEA dissolvidos em 2mL de solução fisiológica à 0,9%, via oral. Os animais desse grupo sofreram influência do modelo de periodontite (Grupo periodontite ovariectomizada DHEA 50mg/Kg; Grupo POD).

4.5.1.2 Avaliação da ação da DHEA nos tecidos gengivais, hepáticos e útero

Na segunda etapa do estudo, novas dosagem de DHEA foram administradas e observados os efeitos desta substância sobre os tecidos hepáticos e uterinos dos animais. Assim, as ratas foram distribuídos de forma randomizada em 3 grupos com 6 animais em cada. Todos os animais receberam doses diárias das suas respectivas substâncias, durante 20 dias. De forma mais detalhada, os grupos apresentaram as seguintes características:

- Grupo 1: formado por ratas ovariectomizadas que receberam doses de 25mg/Kg de DHEA dissolvidos em 2mL de solução fisiológica à 0,9%, via oral. Os animais desse grupo sofreram influência do modelo de periodontite (Grupo periodontite ovariectomizada DHEA 25mg/Kg; Grupo POD25);
- Grupo 2: composto por ratas ovariectomizadas que receberam doses de 12,5mg/Kg de DHEA dissolvidos em 2mL de solução fisiológica à 0,9%, via oral. Os animais desse grupo sofreram influência do modelo de periodontite (Grupo periodontite ovariectomizada DHEA 12,5mg/Kg; Grupo POD12,5);
- Grupo 3: formado por ratas ovariectomizadas que sofreram influência do modelo de indução de periodontite (Os animais desse grupo não receberam dose de DHEA; Grupo PERIO).

4.5.2 Modelo de Indução da Periodontite

A periodontite foi induzida nos primeiros molares inferiores de todos os animais, exceto no grupo de animais que recebeu apenas administração oral de solução fisiológica 0,9% (Grupo Controle). Esse modelo foi realizado por meio da inserção de uma ligadura (fio de nylon) ao redor dos primeiros molares inferiores (fio de sutura 3-0, Shalon®, Goiania, GO, Brasil) por um período de 20 dias. Todos os animais foram anestesiados para realização desse procedimento.

4.5.3 Modelo de ovariectomia das ratas

As ratas permaneceram em jejum durante a noite com o acesso livre à água antes da cirurgia. Após anestesia, foi realizada a fixação dos animais e desinfecção da região abdominal das ratas para que as incisões cirúrgicas fossem feitas. Os ovários dos dois lados foram localizados e removidos junto com o tecido adiposo que os circundam (LEMOS et al., 2013). A incisão foi suturada em dois planos com fio catagute de 3-0 cromado.

4.5.4 Administração das fórmulas farmacêuticas

A solução salina e a DHEA foram administradas de acordo com as características dos grupos. Todos os animais receberam doses orais diárias (administrações orogástricas) dessas substâncias por um período de 20 dias. Para isso, a técnica de contenção mecânica manual preconizada para ratos também foi realizada, como descrito acima (BRASIL, 2005).

4.6 Avaliação dos parâmetros inflamatórios

4.6.1 Índice Gengival

Na medida da profundidade da bolsa periodontal foi utilizada uma sonda periodontal em três pontos específicos do da bolsa: mesiovestibular, disto-vestibular e mediobucal, segundo pesquisa prévia realizada por LIU et al., em 2012.

4.6.2 Avaliação da mobilidade dentária

A mobilidade dos primeiros molares inferiores foi investigada por meio de uma sonda periodontal, utilizando a método descrito por Xu et al., em 2006, que

classificou a mobilidade dentária em três parâmetros qualitativos: fisiológica (+), moderada (++) e intensa (+++).

4.6.3 *Índice de profundidade de sondagem*

A sondagem no periodonto dos primeiros molares inferiores dos animais foi realizada com sonda periodontal milimetrada para investigação do Índice Gengival (IG) e profundidade da bolsa periodontal, esse procedimento ocorreu no primeiro e no 20º dia de experimento com os animais sob anestesia geral com Cloridrato de Xilazina e Cloridrato de Cetamina (como descrito acima). No procedimento de sondagem, a sonda foi mantida por 10 segundos no sulco gengival das superfícies vestibular e lingual, na região proximal, mesial e distal, dos primeiros molares inferiores. Os escores utilizados para o IG foram os descritos em pesquisas anteriores (LÖE, 1967; SEYEDMAJIDI et al., 2014):

- 0 = gengiva normal;
- 1 = inflamação leve (ligeira mudança de cor e discreto edema, mas não ocorre sangramento à sondagem);
- 2 = inflamação moderado (vermelhidão, edema, sangramento à sondagem);
- 3 = grave inflamação (vermelhidão marcada, edema, ulceração com tendência a sangramento espontâneo).

4.6.4 *Análise morfométrica da altura óssea alveolar*

Após eutanásia dos animais, as mandíbulas foram removidas para medir a Altura Óssea Alveolar. Inicialmente, as mandíbulas foram imersas em peróxido de hidrogénio a 30% durante 7 horas, para facilitar a remoção mecânica do tecido mole, e coradas com azul de metileno aquoso (1%). durante 25 minutos, para identificação da junção cimento-esmalte (JCE) (CAMPI et al., 2016). As mandíbulas foram digitalizadas a 1200dpi e as imagens analisadas por um investigador que desconhece as características dos grupos do estudo (análise às cegas), utilizando o software ImageJ. A imagem da altura do osso alveolar para cada hemimandíbula foi capturada utilizando um estereomicroscópio com ampliação de 30 vezes. Para verificação da Altura Óssea Alveolar, foi utilizado o protocolo sugerido por Carvalho et al., em 2017, onde três pontos foram medidos a partir da região lingual: a) A distância obtida medindo-se a altura a partir da junção esmalte-cimento à crista alveolar, na porção anterior (mesial) dos primeiros molares inferiores; b) A distância

obtida por meio da verificação da altura a partir da junção esmalte-cimento à crista alveolar, na raiz mesial dos primeiros molares inferiores; c) A distância obtida medindo-se a altura a partir da junção esmalte-cimento à crista alveolar, na raiz intermediária dos primeiros molares inferiores. Será utilizada a seguinte fórmula para calcular a soma das três Alturas Ósseas Alveolares, referente aos molares direito e esquerdo: $AOA = AOA_{-1/3} + AOA_{-2/3} + AOA_{-3/3}$

4.7 Avaliação de atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)

De acordo com o protocolo adaptado de Chaves et al. (2013), foi realizado o ensaio para avaliação da atividade de mieloperoxidase nos tecidos gengivas, hepáticos e úteros dos animais. Coletou-se, após a eutanásia, e foram armazenados a -70°C . Os tecidos foram pesados entre 25 a 30 mg e, posteriormente, adicionado à solução de HTAB (Brometo de hexadecilmetilamônio) a 0,5% (50mg de tecido/mL) para maceração (macerador elétrico de tecidos). O homogenato descongelado foi submetido ao processo de centrifugação nas condições de 4500rpm, por 20 min, à 4°C . O sobrenadante foi recuperado e dosado atividade de MPO em leitora de enzima-ligada ELISA, utilizando absorvância de 450nm.

4.8 Histologia dos tecidos hepático e uterino

As amostras foram retiradas, cortadas em fragmentos e fixadas em 10% de formaldeído tamponado. A histologia foi de acordo com Carvalho et al. (2017), onde para fixação do tecido e preparação para os procedimentos histológicos as amostras foram mergulhadas em concentrações crescentes de soluções alcoólicas, à 30%, 50%, 70%, 90% e álcool absoluto, em intervalos de tempo de uma hora cada. Para diafanização das amostras, foram utilizados dois banhos em xilol por um tempo de 45 minutos cada, até serem embebidas por banho de parafina líquida. Os cortes foram realizados em secções de 6 μm de espessura por corte. Os cortes obtidos foram passados para lâmina de vidro, coradas por Hematoxilina & Eosina para serem analisadas por microscopia óptica.

4.9 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 6.1. Posteriormente, os dados foram comparados estatisticamente entre grupos e apresentados como média \pm erro padrão da média (E. P. M) com o auxílio do teste

de Análise de Variância (ANOVA) com subsequente teste de Turkey com um nível de confiabilidade de 95%. A diferença estatística foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A patogênese periodontal é mediada por interações entre uma microbiota patogênica e um hospedeiro suscetível pró-inflamatório. Mediadores e citocinas exercem um papel significativo nas alterações do tecido conjuntivo e metabolismo ósseo que leva à quebra de ligamento periodontal e reabsorção do osso alveolar (XU et al., 2006).

É importante destacar que, vários problemas de saúde física e mental estão relacionados à desregulação do eixo HPA na forma de respostas anormais ao cortisol e / ou DHEA ao estresse (CAKMAK et al., 2016; KAMIN & KERTES, 2017; MANINGER et al., 2009). Por exemplo, as respostas do eixo HPA ao estresse podem não ser suficientes para eliminar adequadamente as respostas do sistema imunológico ao estresse, contribuindo eventualmente para um estado contínuo de inflamação, aumentando a suscetibilidade de uma pessoa a doenças inflamatórias (SILVERMAN & STERNBERG, 2012). Logo, as respostas desordenadas ao cortisol e / ou DHEA ao estresse agudo podem representar um mecanismo chave, através do qual a exposição cumulativa ao estresse ao longo da vida influencia a saúde. Apesar de que o cortisol seja, sobretudo anti-inflamatório (SHIELDS et al., 2017), o DHEA desempenha tanto efeitos anti-glucocorticóides (KALIMI et al., 1994) quanto efeitos anti-inflamatórios (MANINGER et al., 2009), alcançando efeitos complexos a atividade do sistema imunológico (PRALL; LARSON; MUEHLENBEIN, 2017).

Estudos que estão sendo realizados levantam possibilidades da DHEA ajudar no metabolismo lipídico e na sensibilidade à insulina e melhorar as respostas imunes e inflamatórias (DAVIS et al., 2011). Como DHEA e DHEAS são precursores importantes na produção de estrogênio e androgênio, a proposta do tratamento com essa substância é uma estratégia que pode auxiliar no alívio dos sintomas de deficiência hormonal em mulheres na pós-menopausa (LABRIE et al., 2011).

Assim, alguns parâmetros importantes para o diagnóstico da periodontite foram estudados, na tentativa de correlacionar o processo inflamatório desencadeado pela periodontite e os efeitos do DHEA em mecanismos relacionados a este processo inflamatório e atividades do sistema imunológico.

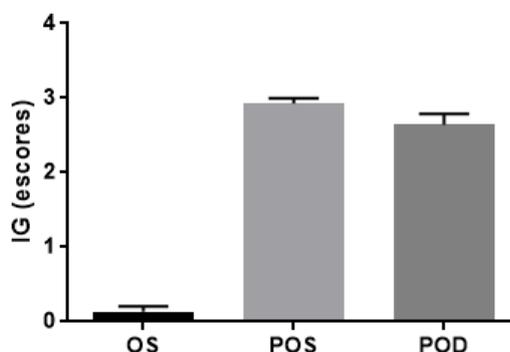
5.1 Avaliação dos parâmetros periodontais

No diagnóstico de doença periodontal, o método de sondagem do espaço periodontal permite estimar a condição estrutural dos tecidos periodontais durante o

exame clínico (AMARO, 2013). No momento que antecede a indução da periodontite deste estudo, foi realizada sondagem do periodonto, onde não foi encontrado alteração clínica significativa, mesmo nas ratas ovariectomizadas. Ao final do experimento, foram observadas alterações em todos os grupos que sofreram indução da periodontite, tanto no grupo que não foi administrado o DHEA, quanto no grupo que recebeu o tratamento, evidenciando a eficácia do método de indução da periodontite utilizado neste estudo (Figuras 6,7 e 8).

O Índice Gengival (IG) avalia os tecidos gengivais ao redor de cada dente, permitindo medir o grau de progresso e severidade do progresso da infecção das gengivas numa escala de 0 a 3 (LÖE; SILLNESS, 1963). A avaliação desse parâmetro mostrou que o grupo POS e o grupo POD) apresentaram escores entre 2 e 3, caracterizados por uma inflamação moderada/grave com vermelhidão da gengiva, sangramento e ulceração, em comparação ao grupo OS que apresentou características gengivais normais ou com leve inflamação. A figura 6 mostra que os escores referentes ao IG foram significativamente maiores nos grupos POS e POD quando comparados ao grupo OS ($p < 0,05$).

Figura 6. Diferença do IG nos grupos POS e POD em relação ao grupo OS.

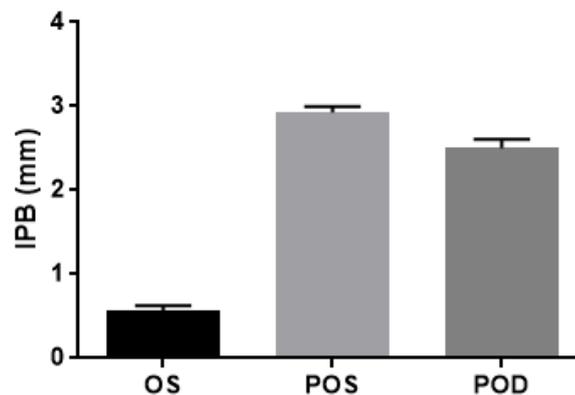


Fonte: Imagem obtida através do software Prism versão 6.0 da GraphPad Software. **Legenda:** Parâmetro do Índice Gengival (IG) foi realizado a partir da sondagem do periodonto. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo (ANOVA seguido pelo teste Newman-Keuls). Em relação ao grupo OS, houve significância estatística do índice gengival quando comparado ao grupo POS e grupo POD. O grupo POD tratado com DHEA não apresentou diferença estatisticamente significativa do seu índice gengival em reação ao índice gengival do grupo POS, que recebeu tratamento com solução fisiológica à 0,9%.

A investigação da mobilidade dentária nos animais mostrou que não houve alteração significativa da neste parâmetro entre os diferentes grupos. No entanto, vale destacar que nem sempre a doença periodontal apresenta sua evolução associada à mobilidade dentária, apesar da importância desse parâmetro (MARTINS, 2010).

A periodontite promove o aprofundamento do sulco gengival, que pode causar a formação bolsa periodontal, quando a distância entre a margem gengival e o fundo da bolsa for maior ou igual a 3 mm, acompanhada pela perda dos tecidos de inserção periodontal (BRAGA et al., 2007). A sondagem para verificação da formação da bolsa periodontal nos animais do grupos POS e POD, ao final do experimento, mostrou significativo aumento no Índice de Profundidade de Bolsa (IPB), quando comparado ao grupo OS. Apesar de não ter obtido um IPB significativo (≥ 3 mm), foi observado valores diferentes nos índices entre os grupos. De acordo com a figura 2, os grupos POS (IPB $1,2 \pm 0,1$ mm) e POD (IPB $1,0 \pm 0,1$ mm) apresentaram IPB significativamente maiores que o do grupo OS (IPB 0,5 mm, $p < 0,05$) (Figura 7). Diante disso, foi possível observar que houve dano no tecido após indução da periodontite e esse dano continuou mesmo depois dos tratamentos com Solução salina (grupo POS) e DHEA (grupo POD).

Figura 7. Diferença do IPB nos grupos POS e POD em relação ao grupo OS.



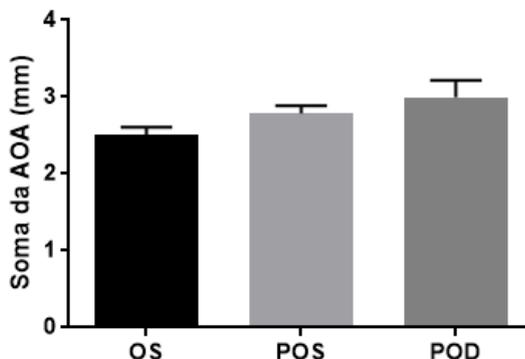
Fonte: Imagem obtida através do software Prism versão 6.0 da GraphPad Software. **Legenda:** O parâmetro do Índice de Profundidade da Bolsa (IPB) foi realizado a partir da sondagem do periodonto. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo (ANOVA seguido pelo teste Newman-Keuls).

Com o resultado da soma dos três pontos avaliados da Altura Óssea Alveolar (AOA), grupo OS $1,3 \pm 0,07$; grupo POS, $1,5 \pm 0,03$ e grupo POD, $1,4 \pm 0,06$, foi possível identificar diferença estatisticamente significativa entre os grupos POD em relação ao grupo OS, $p < 0,05$ (Figura 8). Porém, entre os grupos POS e POD os resultados apresentaram-se estatisticamente semelhantes.

Os resultados demonstraram que a administração de DHEA, na dose de 50mg/kg, não foi capaz de reverter o processo destrutivo do tecido periodontal promovido pela indução da periodontite nos animais do grupo POD. Na periodontite

experimental, a inflamação é rápida e destrutiva para os tecidos, evidenciada por perda óssea significativa em 20 dias (SILVA et al., 2018; TOMOFUJI et al., 2008).

Figura 8. Soma AOA total nos grupos POS e POD em relação ao grupo OS.



Fonte: Imagem obtida através do software Prism versão 6.0 da GraphPad Software. **Legenda:** A avaliação da Altura Óssea Alveolar (AOA) foi realizada a partir da digitalização de imagens das mandíbulas utilizando o software ImageJ. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo (ANOVA seguido pelo teste Newman-Keuls).

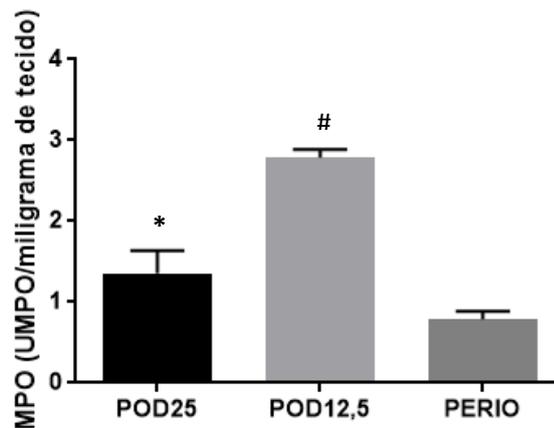
5.2 MPO dos tecidos gengivais, hepáticos e úteros

A MPO é a enzima pró-inflamatória mais abundante estocada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, sendo responsável pela catalização de ácido hipocloroso a partir de peróxido de hidrogênio e geração de outras moléculas reativas. Ensaio de atividade de MPO são amplamente usados para avaliação da inflamação em vários modelos (DAVIS et al., 2011). Na investigação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) no tecido gengival foi observado que nos animais ovariectomizados, que sofreram indução da periodontite e receberam DHEA na dose de 12,5mg/kg (Grupo POD12,5), apresentaram níveis de MPO significativamente maiores que o grupo ovariectomizado, que foi submetido a indução da periodontite e recebeu doses diárias de DHEA de 25mg/kg (Grupo POD25), porém, nestes dois grupos, foi observado alto índice de inflamação gengival quando comparado ao grupo ovariectomizado que sofreu a indução da periodontite e não recebeu o tratamento com DHEA.

Com base nesses resultados, observou-se que a DHEA não apresentou ação terapêutica significativa sobre o tecido periodontal afetado e as doses utilizadas podem ter provocado variação hormonal nas ratas que culminou no agravamento do quadro inflamatório decorrente da ovariectomia e da indução da

periodontite. Variados estudos (EMINGIL et al., 2019; POLIZZI et al., 2020) mostram que altos índices de MPO são associados com a periodontite e que a concentração dessa enzima no tecido periodontal está relacionada com o estado clínico da doença. Ademais, os níveis de MPO em outros tecidos afetados pela periodontite também apresentam-se aumentados, como no tecido hepático (VASCONCELOS et al., 2019).

Figura 9. Níveis de MPO do tecido gengival entre os grupos POD25, POD12,5 em relação ao grupo PERIO.



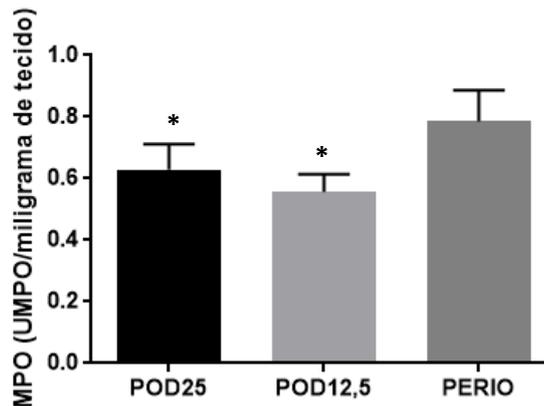
Fonte: Imagem obtida através do software Prism versão 6.0 da GraphPad Software. **Legenda:** A atividade da enzima MPO foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls). # indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos POD25 e POD12,5 ($p > 0,05$). * indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos POD25 e PERIO ($p < 0,05$).

Ademais, as bactérias patogênicas do periodonto possuem a capacidade de se propagarem a partir da corrente sanguínea, podendo alcançar os diferentes órgãos, contribuindo como fonte de infecção no organismo dos indivíduos e promovendo o aparecimento de abscessos hepáticos derivados da dessa infecção por bactérias periodontais (ELHASSAN & PEERAN, 2016).

No presente estudo, diferentemente do tecido gengival, foi observado que no tecido hepático das ratas, a administração diária de DHEA nas concentrações de 12,5mg/kg e 25mg/kg, promoveu um efeito protetor no fígado das ratas, diminuindo a atividade neutrofílica e promovendo um menor grau de infiltrado celular comparados ao níveis de MPO apresentados pelo grupo que não recebeu o tratamento com do DHEA (grupo PERIO). O DHEA é amplamente utilizado como suplemento dietético, mas ainda há dados insuficientes sobre seus efeitos clínicos.

Vários estudos mostraram que alguns efeitos benéficos do DHEA podem estar relacionados às suas propriedades antioxidantes, além de seu efeito positivo sobre o nível de espécies reativas de oxigênio (ROS), em sistemas de defesa antioxidante e danos oxidativos em células (KIERSZTAN et al., 2021) (Figura 10).

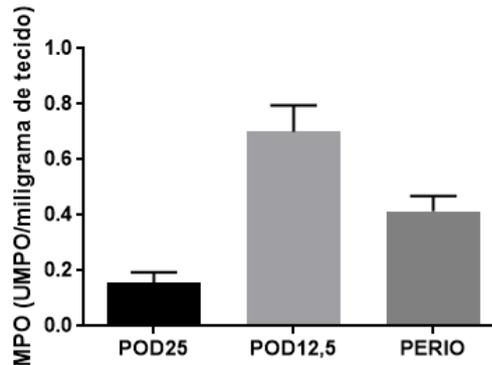
Figura 10. Níveis de MPO do fígado entre os grupos POD25 e POD12,5 em relação ao grupo PERIO.



Fonte: Imagem obtida através do software Prism versão 6.0 da GraphPad Software. **Legenda:** A atividade da enzima MPO foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

No tecido uterino, o gráfico demonstra que os animais ovariectomizados, que sofreram a indução da periodontite e receberam DHEA na dose de 12,5mg/kg tiveram um elevado índice de MPO, demonstrando que o tecido apresentou um provável aumento do estresse oxidativo gerado pelo processo inflamatório. Sugere-se aqui que essa inflamação possa ser decorrente dos efeitos das variações hormonais provocadas pela ovariectomia associados à periodontite induzida. Já entre os animais ovariectomizados, com periodontite induzida e que receberam doses diárias de 25mg/kg de DHEA, o estresse oxidativo do tecido foi significativamente menor comparados às ratas do grupo 2 e 3, que receberam DHEA na dose de 12,5mg/kg e não receberam DHEA, respectivamente ($p < 0,05$).

Figura 11. Gráfico da diferença entre os níveis de MPO do tecido uterino entre os grupos 1 POD25, 2 POD12,5 e 3 PERIO.

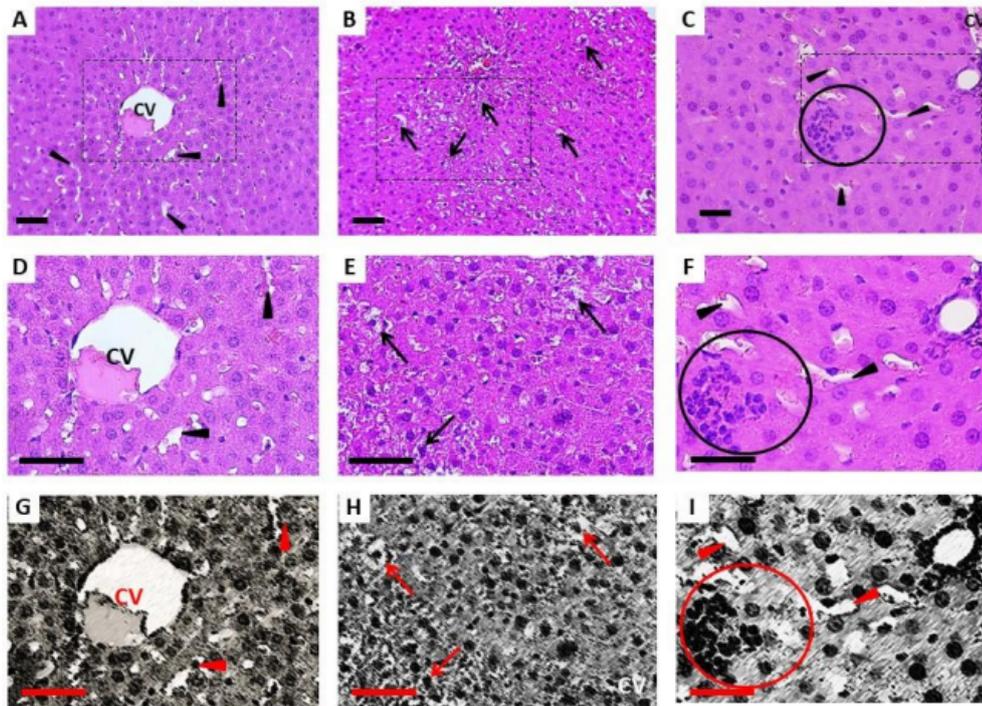


Fonte: Imagem obtida através do software Prism versão 6.0 da GraphPad Software. **Legenda:** A atividade da enzima MPO foi medida por espectrofotometria. Os resultados estatísticos são expressos como média \pm erro de 6 animais por grupo. (ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

5.3 Histologia dos tecidos hepático e uterino

O processamento e análise histológica do tecido hepático de todos os grupos foram realizados. O grupo 1 com ratas ovariectomizadas, com periodontite e que receberam 25mg/kg de DHEA apresentou uma organização característica do tecido hepático (figura 1 A, D e G) na qual pode-se observar os hepatócitos enfileirados em direção à veia centrolobular e separados por espaços sinusoides. Na literatura, muitos estudos reportam um efeito positivo da DHEA sobre as espécies reativas de oxigênio e nos sistemas de defesa antioxidante com consequentemente diminuição do dano proveniente do estresse oxidativo (KIERZTAN et al., 2021). Possivelmente, esse efeito se dá pela capacidade da DHEA de quelar metais, pela melhora na performance de enzimas antioxidantes (MIYAZAKI et al., 2016) ou pela ação dos metabólitos da biotransformação da DHEA após suplementação, visto que derivados da DHEA, como a androstenediol e androstenetriol, demonstram ser potentes reguladores da resposta imune e que possuem propriedades antioxidantes contra peroxidação lipídica dependente de íons (TAMAGNO et al., 1998). Assim, o estresse oxidativo da periodontite sobre o tecido hepático foi amenizado neste grupo.

Figura 12. Avaliação histopatológica do fígado dos grupos. A), D) e G), do grupo POD25, apresentam aspectos normais do fígado com veia central (CV) e sinusóides (cabeça de seta). Ademais, pode-se observar diminuição da esteatose nos hepatócitos e preservação dos sinusóides. B), E) e H) demonstram hepatócitos com esteatose microvesicular (setas) no grupo POD12,5 e desorganização dos sinusóides. C), F) e I), do grupo PERIO, mostram um infiltrado inflamatório (círculo). A), B), C), D), E) e F) estão coradas com hematoxilina e eosina (HE) e as imagens G), H) e I) estão com filtro, destacando estruturas pouco coradas pela HE. D), E) e F) representam a área de dentro do retângulo pontilhado. A barra no canto esquerdo inferior representa 40 micrômetros.



Fonte: Próprio autor.

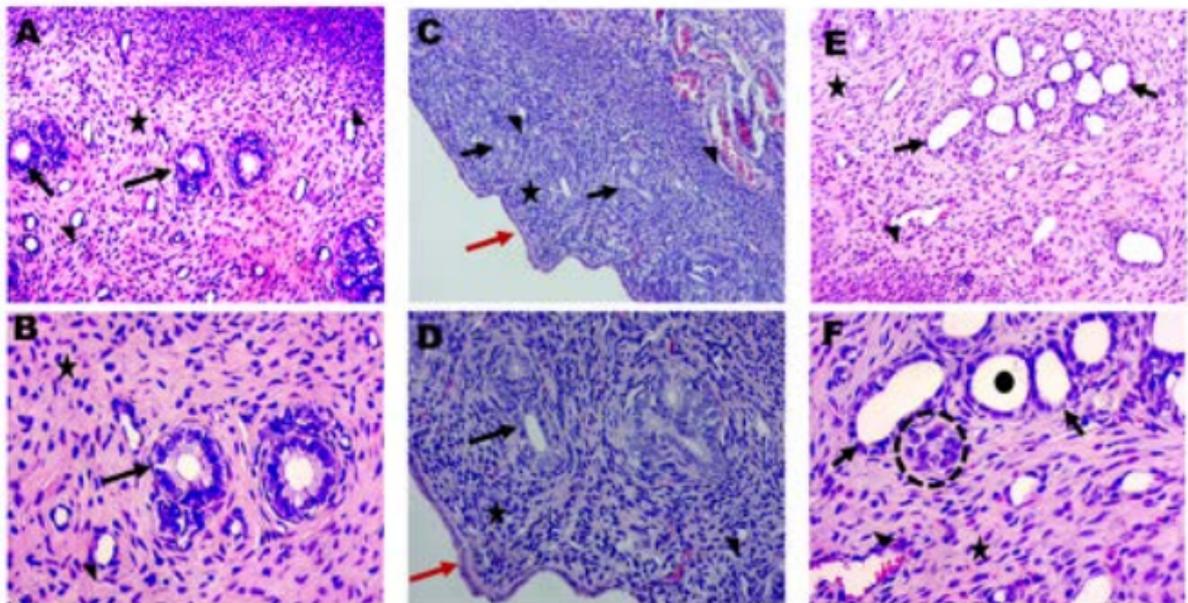
O grupo POD12,5 com ratas ovariectomizadas, com periodontite e que receberam 12,5mg/kg de DHEA apresentou certo grau de desorganização com espaços em que não é possível observar a organização típica do fígado, além de alguns hepatócitos com esteatose microvesicular (figura 1 B, E e H). Em contraste com esse achado, um modelo de câncer de mama em ratos obesos, a suplementação com DHEA reduziu o ganho de peso e diminuiu o score de esteatose no fígado quando comparado ao grupo controle (HAKKAK; BELL; KOROURIAN, 2017). O grupo PERIO com ratas não ovariectomizadas, com periodontite e sem tratamento com DHEA apresentou um tecido sem a organização característica do fígado e com infiltrado inflamatório (figura 1 C, F e I). Pode-se observar que os hepatócitos não se encontram enfileirados e há ausência da visualização dos espaços sinusoides. Tais características já foram observadas em estudos que

utilizaram um modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos. O fígado desses animais, dependendo do tempo de indução, pode apresentar desde as características acima mencionadas até o desenvolvimento de esteatose microvesicular (CARVALHO et al., 2017).

A análise histopatológica do tecido uterino mostrou diferença entre os grupos analisados. O tecido uterino do grupo POD25 (ratas ovariectomizadas, com periodontite e tratadas com 25mg/kg de DHEA) mostrou aspectos celulares comuns do tecido normal, com vasos sanguíneos, glândulas colunares funcionais e abundante matriz extracelular, sugerindo que o tratamento com o DHEA, nessa dose, teve um efeito anti-inflamatório considerável. O grupo dois, tratado com 12,5mg/kg de DHEA, ovariectomizadas e com periodontite, também mostrou aspectos teciduais normais. No grupo PERIO, com os animais ovariectomizados e com a indução da periodontite, apresentou infiltrado inflamatório e glândulas com aspecto atrofiado, lúmen aumentado e células achatadas.

A periodontite é caracterizada pela formação de EROs decorrente da intensa resposta inflamatória ao biofilme bacteriano dentário que, por sua vez, pode cair na corrente sanguínea e provocar danos em outros tecidos. O tecido uterino pode sofrer danos decorrentes das EROs, assim como os demais órgãos do sistema reprodutor feminino (MARKOWSKA et al., 2015). A literatura mostra que a periodontite afeta outros órgãos, induzindo a um processo inflamatório. No estudo de Vasconcelos e colaboradores (2019), o fígado dos animais com periodontite apresentou aumento de esteatose, presença de hepatócitos binucleados e hepatócitos positivos para AlkP, além de escore aumentado para inflamação e necrose no tecido hepático. Alterações no tecido renal também já foram relatadas, sendo consequência do estresse oxidativo proveniente da periodontite (FRANÇA et al., 2017).

Figura 13. Representação do tecido uterino dos grupos analisados. A e B, do grupo POD25, apresentam o estroma uterino do endométrio (estrela) com vasos sanguíneos (cabeça de seta) e glândulas uterinas (setas pretas). As células tubulares das glândulas se mostram robustas com aspecto colunar típico do epitélio da fase reprodutiva, assim como estroma com abundante matriz extracelular, vasos sanguíneos e fibroblastos. C e D, do segundo grupo, apresentam um estroma uterino delimitado pelo epitélio de revestimento (seta vermelha) apresentando glândulas uterinas e vasos sanguíneos. Observa-se que as glândulas uterinas responderam positivamente para o tratamento com DHEA, mostrando-se com células com aspecto colunar. E e F, do grupo PERIO, mostram o estroma (endométrio) destacando um aglomerado de glândulas uterinas, alguns vasos e um infiltrado inflamatório (circunferência pontilhada). As células tubulares encontram-se atrofiadas com lúmen aumentado (círculo preto) e aspecto achatado. A, C e E com aumento de 20x e B, D e F, 40x. Lâminas coradas com hematoxilina e Eosina (HE).



Fonte: Próprio autor.

6. CONCLUSÃO

A periodontite induzida por ligadura causou alterações clínicas e morfométricas no tecido periodontal, comprovado pelo aumento da perda óssea alveolar, dos índices de sangramento gengival e profundidade da bolsa. O tratamento de animais com DHEA não foi capaz de reduzir os parâmetros inflamatórios orais e perda óssea alveolar característica da doença. Portanto, faz-se necessários novos experimentos com diferentes doses de DHEA, para avaliar os efeitos da suplementação da substância em relação à periodontite. Apesar de não ter uma ação protetora no tecido gengival, podendo até acentuar o estresse oxidativo decorrente da ovariectomia, da indução da periodontite ou da associação de ambos, pode ter protegido o tecido uterino contra a ação da inflamação na dose de 25 mg/kg, considerando a análise da mieloperoxidase e da histologia do tecido uterino. Além disso, o estudo demonstra que a periodontite pode induzir inflamação uterina em animais ovariectomizados, considerando que o grupo de animais ovariectomizados e com periodontite induzida apresentou significativo estresse oxidativo no tecido uterino e histologia compatível com processo inflamatório. Foi possível observar um efeito positivo da suplementação de DHEA sobre o tecido hepático dos animais ovariectomizados com periodontite. Houve uma preservação da estrutura dos hepatócitos e dos espaços sinusoides nos grupos suplementados – o que não foi observado no grupo sem suplementação.

7. REFERÊNCIAS

- ALOIA, T. P. A. **Alterações celulares, moleculares e funcionais de fígados de ratos Wistar tratadas com fatores hepatotróficos**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- AMARO, C. Avaliação clínica da profundidade à sondagem dos sulcos gengivais em adultos jovens clinicamente saudáveis. 2013.
- ARIGBEDE, A. O.; BABATOPE, B. O.; BAMIDELE, M. K. Periodontitis and systemic diseases: A literature review. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 16, n. 4, p. 487, 2012.
- ARMINGOHAR, Z. et al. Polymorphisms in the interleukin-1 gene locus and chronic periodontitis in patients with atherosclerotic and aortic aneurysmal vascular diseases. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.79, p.338-345, 2014.
- BERTULUCCI, L. A. B. et al. Doença periodontal em mulheres na pós-menopausa e sua relação com a osteoporose. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 34, p. 563-567, 2012.
- BHAWNA, G. et al. A comparative study of CEE, tibolone, and DHEA as hormone replacement therapy for surgical menopause. **The Journal of Obstetrics and Gynecology of India**. 2013;63(3):194-198.
- BRAGA, F. et al. Artrite crônica e periodontite. **Rev. Bras. Reumatol**, p. 276-280, 2007.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Resolução Normativa CONCEA nº 33, de 18.11.2016**. 98pags. 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz. **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório**. 28pags. 2005.
- CAKMAK, O. et al. Gingival crevicular fluid and saliva stress hormone levels in patients with chronic and aggressive periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 43, n. 12, p. 1024-1031, 2016.
- CAMPI, P. et al. Endothelial dysfunction in rats with ligature-induced periodontitis: Participation of nitric oxide and cyclooxygenase-2-derived products. **Archives of Oral Biology**, v.63, p.66-74, 2016.
- CARVALHO, J. S. et al. Steatosis caused by experimental periodontitis is reversible after removal of ligature in rats. **Journal of Periodontal Research**, v.00 p. 1-09, 2017.
- CHAVES, L. S. et al. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria*

caudata. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 35, n. 1, p. 93-100, 2013.

CIESIELSKA, A. et al. Changes in the Oral Cavity in Menopausal Women—A Narrative Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 1, p. 253, 2021.

DAVIS, S. et al. DHEA replacement for postmenopausal women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 96, n. 6, p. 1642-1653, 2011.

DUBAR, M. et al. Relations of psychosocial factors and cortisol with periodontal and bacterial parameters: a prospective clinical study in 30 patients with periodontitis before and after non-surgical treatment. **International journal of environmental research and public health**, v. 17, n. 20, p. 7651, 2020.

ELHASSAN, A. T.; PEERAN, S. W. The linking mechanisms between liver and periodontal diseases. **EC dental science**, v. 2, p. 758-766, 2016.

EMINGIL, G. et al. Adjunctive effects of a sub-antimicrobial dose of doxycycline on clinical parameters and potential biomarkers of periodontal tissue catabolism. **Dentistry Journal**, v. 7, n. 1, p. 9, 2019.

FERNANDES, N. F. S. et al. Acesso ao exame citológico do colo do útero em região de saúde: mulheres invisíveis e corpos vulneráveis. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 35, p. e00234618, 2019.

FLIER, J. S. The adipocyte: storage depot or node on the energy information superhighway?. **Cell**, v. 80, n. 1, p. 15-18, 1995.

FRANÇA, L. F. C. et al. Periodontitis changes renal structures by oxidative stress and lipid peroxidation. **Journal of clinical periodontology**, v. 44, n. 6, p. 568-576, 2017.

GENAZZANI, A. D. et al. Oral dehydroepiandrosterone supplementation modulates spontaneous and growth hormone-releasing hormone-induced growth hormone and insulin-like growth factor-1 secretion in early and late postmenopausal women. **Fertility and sterility**, v.76, p.241-248, 2001.

GENCO, R. J.; SANZ, M. Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: An overview. **Periodontology 2000**, v. 83, n. 1, p. 7-13, 2020.

HAKKAK, R. BELL, A. KOROURIAN, S. Dehydroepiandrosterone (DHEA) feeding protects liver steatosis in obese breast cancer rat model. **Scientia Pharmaceutica**, v. 85, n. 1, p. 13, 2017.

HOSSEINI, V. et al. Current progress in hepatic tissue regeneration by tissue engineering. **Journal of translational medicine**, v. 17, n. 1, p. 1-24, 2019.

HUANG, X. et al. The roles of osteocytes in alveolar bone destruction in periodontitis. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1-15, 2020.

HUBER, D.M. et al. Androgens suppress osteoclast formation induced by RANKL and macrophage colony stimulating factor. **Endocrinology**, v.142, p.3800-3808, 2001.

KAMBALYAL, P. et al. Comparison of salivary calcium level in smokers and non-smokers with chronic periodontitis, aggressive periodontitis, and healthy controls. **Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry**, v.5, p.68-73, 2015.

KAMIN, H. S.; KERTES, D. A. Cortisol and DHEA in development and psychopathology. **Hormones and behavior**, v. 89, p. 69-85, 2017.

KASSEBAUM, N. J. et al. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. **Journal of dental research**, v. 96, n. 4, p. 380-387, 2017.

KE, Y. et al. Serum levels of sex steroids and metabolites following 12 weeks of intravaginal 0.50% DHEA administration. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 154, p. 186-196, 2015.

KIERSZTAN, A. et al. DHEA-pretreatment attenuates oxidative stress in kidney-cortex and liver of diabetic rabbits and delays development of the disease. **Biochimie**, v. 185, p. 135-145, 2021.

LABRIE, F. et al. Efficacy of intravaginal dehydroepiandrosterone (DHEA) on moderate to severe dyspareunia and vaginal dryness, symptoms of vulvovaginal atrophy, and of the genitourinary syndrome of menopause. Menopause: **The Journal of The North American Menopause Society**. 23(3):243-256; 2016.

LABRIE, F. et al. Is DHEA a hormone? Starling review. **Journal of Endocrinol**, v. 187, p. 169-196, 2005.

LABRIE, F. et al. Wide distribution of the serum dehydroepiandrosterone and sex steroid levels in postmenopausal women: role of the ovary? **Menopause**, v. 18, n. 1, p. 30-43, 2011.

LEE, Y. Association between osteoporosis and periodontal disease among menopausal women: The 2013– 2015 Korea National Health and Nutrition Examination Survey. **PloS one**, v. 17, n. 3, p. e0265631, 2022.

LEMOS, C. C. S. et al. Effect of castration on renal glycosaminoglycans and their urinary excretion in male and female rats with chronic renal failure. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.46, p.567-573, 2013.

LI, Y. et al. A dose-response and meta-analysis of dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation on testosterone levels: Perinatal prediction of randomized clinical trials. **Experimental gerontology**, v. 141, p. 111110, 2020.

LÖE, H.; SILNESS, J. Periodontal disease in pregnancy. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.21, p.533-551, 1973. 15.

LÖE, H.; SILNESS, J.. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. **Acta odontologica scandinavica**, v. 21, n. 6, p. 533-551, 1963.

MANINGER, N. et al. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 30, n. 1, p. 65-91, 2009.

MARKOWSKA, A. et al. Oxidative stress markers in uterine fibroids tissue in pre-and postmenopausal women. **Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology**, v. 42, n. 6, p. 725-729, 2015.

MARTINS, A. Fundamentos para esplintagem de dentes pilares com suporte periodontal reduzido. 2010.

MEDEIROS, S. F.; MAITELLI, A.; NINCE, A. P. B.. Efeitos da terapia hormonal na menopausa sobre o sistema imune. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, p. 593-601, 2007.

MICHAEL, H. et al. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.20, p.2224-2232, 2005.

MIYAZAKI, H. et al. Dehydroepiandrosterone alters vitamin E status and prevents lipid peroxidation in vitamin E-deficient rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, p. 15-133, 2016.

PRALL, S. P.; LARSON, E. E.; MUEHLENBEIN, M. P. The role of dehydroepiandrosterone on functional innate immune responses to acute stress. **Stress and Health**, v. 33, n. 5, p. 656-664, 2017.

POLIZZI, A. et al. Influence of Myeloperoxidase Levels on Periodontal Disease: An Applied Clinical Study. **Applied Sciences**, v. 10, n. 3, p. 1037, 2020.

SANZ, M. et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. **Journal of clinical periodontology**, v. 47, n. 3, p. 268-288, 2020.

SCANNAPIECO, F. A.; GERSHOVICH, E. The prevention of periodontal disease—An overview. **Periodontology 2000**, v. 84, n. 1, p. 9-13, 2020.

SEYEDMAJIDI, S. A. et al. Effect of Zinc-Deficient Diet on Oral Tissues and Periodontal Indices in Rats . **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**, v.3, p.81-87, 2014.

SHIELDS, G. S. et al. The effects of acute stress on episodic memory: A meta-analysis and integrative review. **Psychological bulletin**, v. 143, n. 6, p. 636, 2017.

SILVA, F. R. et al. One or two ligatures inducing periodontitis are sufficient to cause fatty liver. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal. Ed. inglesa**, v. 23, n. 3, p. 4, 2018.

SILVERMAN, M. N.; STERNBERG, E. M. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. **Annals of the new York Academy of Sciences**, v. 1261, n. 1, p. 55-63, 2012.

SURI, V.; SURI, V. Menopause and Oral Health. **Journal of Mid-Life Health**, v.5, p.115, 2014.

TAMAGNO, E. et al. Oxygen free radical scavenger properties of dehydroepiandrosterone. **Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease**, v. 16, n. 1, p. 57-63, 1998.

TEIXEIRA, F. C. et al. Periodontal attachment loss and associations with sociodemographic and behavioral risk indicators. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 48, 2019.

TOMOFUJI, T. et al. Oxidative damage of rat liver induced by ligature-induced periodontitis and chronic ethanol consumption. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 12, p. 1113-1118, 2008.

VASCONCELOS, A. C. C. G. et al. Periodontitis causes abnormalities in the liver of rats. **Journal of periodontology**, v. 90, n. 3, p. 295-305, 2019.

VILLAREAL, D. et al. Effects of DHEA Replacement on Bone Mineral Density and Body Composition in Elderly Women and Men. **Clinical Endocrinology**, v.53, p.561–568, 2000.

WANG, Y.; ANDRUKHOV, O.; RAUSCH-FAN, X. Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 910, 2017.

XU, Y; WEI, W. A comparative study of systemic subantimicrobial and topical treatment of minocycline in experimental periodontitis of rats. **Archives of oral biology**, v. 51, n. 9, p. 794-803, 2006.

ZULKEPLE B., et al. The effect of menopause on chronic periodontitis. **Journal of International Dental and Medical Research**, v.9, p.45, 2016.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA/UFPI)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Ministro Reis Velloso, Av. São Sebastião, n. 2819, Parnaíba, Piauí, Brasil; CEP: 64204-035
 Telefone (86) 3323-5251 e-mail: cesacmrp@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Estudo do potencial terapêutico da dehidroepiandrosterona sobre os efeitos locais e sistêmicos da periodontite induzida em ratos**”, registrada nº **004/19**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Manoel Dais de Souza Filho do Curso Biomedicina do Campus Ministro Reis Velloso/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **15/03/2019**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Julho/ 2019 à Julho/ 2023
Espécie/Linhagem/raça	Ratos, <i>Rattus norvegicus</i> - heterogênico (Wistar)
Nº de Animais	73
Peso/ Idade	200-260g/3meses
Sexo	Machos (33) e Fêmeas (40)
Origem	Blotário Central da Universidade Federal do Piauí

Parnaíba, 15 de Março de 2019.


 Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos
 (Coordenador da CEUA/CMRV-UFPI)