

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

REBECA BACCHI VILLANOVA

**AVALIAÇÃO DE INDICADORES SISTÊMICOS DE SAÚDE ANTES E APÓS
O TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL EM CÃES
Evaluation of systemic health indicators before and after treatment of
periodontal disease in dogs**

**CURITIBA
2019**

REBECA BACCHI VILLANOVA

**AVALIAÇÃO DE INDICADORES SISTÊMICOS DE SAÚDE ANTES E APÓS
O TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL EM CÃES**

**Evaluation of systemic health indicators before and after treatment of
periodontal disease in dogs**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Doutor em Saúde, Tecnologia e Produção Animal Integrada.

Orientador: Prof. Jair Rodini
Engracia Filho

CURITIBA

2019

FOLHA DE APROVAÇÃO



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Câmpus Curitiba

PUCPR
GRUPO MARISTA

ATA Nº 0008 E PARECER FINAL DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA REBECA BACCHI VILLANOVA

Aos vinte e cinco dias do mês de setembro do ano de dois mil e dezenove, às 13 horas e 30 minutos, realizou-se na sala de vídeo 02, térreo, Bloco Verde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Campus de Curitiba, Rua Imaculada Conceição, nº 1155, Prado Velho – Curitiba – PR, a sessão pública de defesa da tese da doutoranda Rebeca Bacchi Villanova, intitulada: **“AVALIAÇÃO DE INDICADORES SISTÊMICOS DE SAÚDE ANTES E APÓS O TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL EM CÃES”**. A doutoranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor orientador e Presidente da banca, Dr. Jair Rodini Engracia Filho (PUCPR), auxiliado pelos Professores Doutores Gervasio Henrique Bechara (PUCPR), Vinicius Augusto Tramontina (PUCPR), Rogério Ribas Lange (UFPR) e Rosangela Locatelli Dittrich (UFPR). Procedeu-se à exposição da tese, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a tese, que foi considerada

aprovada

MEMBROS

Prof Dr Jair Rodini Engracia Filho - Orientador
Prof Dr Gervasio Henrique Bechara (PUCPR)
Prof Dr Vinicius Augusto Tramontina (PUCPR)
Prof Dr Rogério Ribas Lange (UFPR)
Prof Dr Rosangela Locatelli Dittrich (UFPR)

ASSINATURA

[Handwritten signatures of the examiners]

Proclamado o resultado, o Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 25 de setembro de 2019.

[Handwritten signature of Caroline Nocera Bertton]

Caroline Nocera Bertton
Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

[Handwritten signature of Prof. Dra. Renata Ernland Freitas de Macedo]

Prof. Dra. Renata Ernland Freitas de Macedo
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS.....	7
FORMATO DA TESE.....	9
RESUMO GERAL	10
ABSTRACT.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
CAPÍTULO 1.....	13
1. DOENÇA PERIODONTAL: DEFINIÇÃO E ETIOPATOGENIA	13
2. CONSEQUÊNCIAS SISTÊMICAS DA DOENÇA PERIODONTAL	21
3. OBJETIVOS	27
CAPÍTULO 2.....	28
Avaliação de indicadores sistêmicos de saúde antes e após o tratamento da doença periodontal em cães	28
CAPÍTULO 3	65
CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
REFERÊNCIAS	67
ANEXOS	77
A. Parecer de aprovação da CEUA- PUCPR.....	77
B. Normas da revista <i>Research in Veterinary Science</i>	78

*Dedico aos meus filhos Pedro e Maitê,
presentes enviados por Deus!!!*

*“Ser profundamente amado por alguém
nos dá força; amar alguém
profundamente nos dá coragem”.*

Lao-Tsé

“Quando você fala, está apenas repetindo aquilo que você já sabe. Mas se você escuta, então pode aprender algo novo”.

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado entre muitas bênçãos, mais essa oportunidade de aperfeiçoamento profissional em meio a uma fase tão especial da minha vida, em que os meus dois filhos, ainda pequenos, completam os meus dias com amor e alegrias. Quando o cansaço tomava conta em meio ao trabalho, aos estudos e aos cuidados com os meus filhos, era a certeza do propósito de Deus que me conduzia a seguir a caminhada.

Agradeço a minha mãe Clarita Bacchi, por ter de maneira mais que especial, cumprido as missões de ser pai e mãe, sempre presente e não medidora de esforços para me ver feliz e realizada. E com o seu infinito amor, ainda me auxiliou nos cuidados com os meus filhos, desempenhando papel de super avó, para que eu pudesse me ausentar para a realização de mais esse projeto de vida. Faltam palavras para descrever este sentimento de amor e de gratidão que tenho por você mãezinha, esta conquista também é sua, saiba que reconheço e valorizo a sua abdicação de sonhos para a realização dos meus.

Ao meu querido pai Paulo Bordin Bacchi, que partiu tão cedo, fica a gratidão, as lembranças e a certeza que haverá o reencontro.

Ao Lino Tasso Ravaglio Jr., meu padastro, agradeço o carinho comigo e com meus filhos, e o estímulo constante para conquistar meus ideais.

A minha amada irmã Heloísa Ravaglio, por auxiliar nos cuidados com os meus filhos amados. É o maior presente que minha mãe poderia ter me dado.

Ao meu amado esposo José Ademar Villanova Jr., agradeço o carinho, a cumplicidade, o amor incondicional e o companheirismo. Sua paciência e compreensão por abdicar momentos ao meu lado foram fundamentais para a realização de cada etapa deste trabalho. Além disso, agradeço os cuidados com os nossos filhos, que privilégio para nossos pequenos terem um pai tão amoroso e de caráter invejável.

Aos meus filhos Pedro Bacchi Villanova e Maitê Bacchi Villanova, simplesmente agradeço por terem me escolhido para ser sua mãe, que privilégio o meu tê-los na minha vida. Qualquer desafio tem mais sentido por ter vocês. Não há palavras que traduzam o meu amor.

Agradeço a Profa. Antônia Maria Leme do Prado pelo estímulo e

exemplo. Seus ensinamentos guiaram os meus passos para o conhecimento da Odontologia Veterinária.

Ao Prof. Jair Rodini Engracia Filho, agradeço a orientação e a confiança.

Agradeço aos meus queridos colegas de trabalho, os anestesiistas Paulo Klaumann, Rafaela Barotto e Vinícius Tavares, que participaram da realização desse estudo tornando os momentos de trabalho mais leves e descontraídos. Especialmente agradeço a minha amiga e colega de especialidade Naréu Simas de Carvalho Harrison, que auxiliou na realização do estudo.

À equipe do laboratório de patologia clínica CLINILAB®, que com primor organizaram e armazenaram as amostras, além da qualidade nas análises realizadas.

Ao laboratório IDEXX do Brasil pela parceria e pela prova constante de competência, dedicação e amizade da Aline Baumann da Rocha.

Minhas amigas Kelly Mello e Patrícia Mosko, agradeço a irmandade, vocês são presentes que a vida me deu. Com a amizade de vocês qualquer desafio se torna mais fácil. Amo vocês!!!

Agradeço a minha amiga e colega de trabalho Thaís Andrade Costa Casagrande ao estímulo e pelo grande exemplo pessoal e profissional.

Aos cães e seus tutores, utilizados neste estudo, tenham a certeza que toda a atenção, preocupação e carinho foram depositadas nesses especiais animais. Agradeço a confiança.

FORMATO DA TESE

A presente tese é composta por capítulos. O capítulo 1 apresenta uma introdução geral, a contextualização do tema, a justificativa e os objetivos de estudo. O capítulo 2 refere-se a artigo científico completo, contendo referências, e formatado nas normas do periódico *Research in Veterinary Science* para o qual será submetido. O capítulo 3 finaliza esta tese com conclusões gerais e considerações finais deste trabalho e sugestões para estudos futuros. As referências do capítulo 1 encontram-se ao final da tese.

RESUMO GERAL

A doença periodontal (DP) é a afecção odontológica mais comum em cães, com prevalência em torno de 80% em animais acima de quatro anos. Em seres humanos as consequências sistêmicas da DP são inúmeras, com grande impacto sobre doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, alterações na gravidez, doença renal crônica, entre outras. Poucos estudos têm sido realizados sobre este tema em cães, mas já com evidências de que a afecção oral também pode comprometer a saúde dos animais. Diante da alta prevalência da DP na população canina, do risco de doenças sistêmicas e da escassez de trabalhos na medicina veterinária, o objetivo do estudo foi verificar se cães adultos com diferentes graus de DP apresentam alteração em indicadores sistêmicos de saúde. Foram selecionados 36 cães com DP em estágios 1 (grupo A), 2 e 3 (grupo B) e 4 (grupo C) sem comorbidades (n= 12 animais por grupo), atendidos no Hospital Veterinário Clinivet®, localizado em Curitiba – PR – Brasil. Todos os animais foram submetidos ao tratamento periodontal. Quanto ao escore de gengivite, seis animais apresentaram gengivite grau 1, 27 cães grau 2 e três indivíduos grau 3. As análises realizadas entre os momentos pré e pós-tratamento periodontal em cada grupo, demonstraram haver diferença nos valores de eritrócitos ($p=0,034$), estando mais baixo no momento pré do grupo C em comparação com o momento pós; albumina ($p=0,010$), com valores séricos inferiores no momento pré tratamento do grupo C se comparado ao momento pós e a IL-6 ($p = 0,007$) com concentrações séricas mais elevadas no momento pré do grupo A, quando comparada ao momento pós-tratamento. As comparações entre os grupos A, B e C em cada momento demonstraram diferença nas concentrações de SDMA ($p = 0,0123$), no momento pós entre os grupos B (média = 9,17 µg/dL) e C (média = 11,83 µg/dL). Analisando individualmente os valores do SDMA pré e pós-tratamento em cada grupo, houve redução de 66,7 % (n=8) dos animais, no grupo B em 42% (n=5) deles e no grupo C em apenas 25% (n=3) dos cães. Houve correlação negativa entre eritrócitos e SDMA, leucócitos e albumina e SDMA e albumina. Não foi observada correlação entre gengivite e as demais variáveis. Os resultados deste estudo prospectivo intervencionista revelaram associações entre a DPI e indicadores sistêmicos de saúde sob aspecto inflamatório e renal, mesmo em estágios iniciais da doença. Embora nenhuma relação causal possa ser comprovada pelo presente estudo, a associação da doença oral à carga inflamatória sistêmica geral e à saúde de órgãos destaca a necessidade de pesquisa continuada e a importância do tratamento precoce da infecção oral em cães para evitar danos irreversíveis locais e sistêmicos.

Palavras-chave: gengivite; periodontite; cão; inflamação.

ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is the most common dental condition in dogs, with a prevalence of around 80% in animals over four years old. In humans, the systemic consequences of PD are numerous, with great impact on cardiovascular disease, diabetes mellitus, changes in pregnancy, chronic kidney disease, among others. Few studies have been conducted on this subject in dogs, but with evidence that oral disease can also compromise the health of animals. Given the high prevalence of PD in the canine population, the risk of systemic diseases and the scarcity of work in veterinary medicine, the objective of the study was to verify if adult dogs with different degrees of PD present changes in systemic health indicators. Thirty-six dogs with PD in stages 1 (group A), 2 and 3 (group B) and 4 (group C) without comorbidities ($n = 12$ animals per group), treated at Clinivet Veterinary Hospital, located in Curitiba - PR - Brazil, were selected. All animals underwent periodontal treatment. Regarding the gingivitis score, six animals presented grade 1 gingivitis, 27 grade 2 dogs and three individuals grade 3. The analyzes performed between the times before and after periodontal treatment in each group showed a difference in erythrocyte values ($p = 0,034$), being lower in the pre group C time compared to the post moment; albumin ($p = 0,010$), with lower serum values at the pre-treatment time of group C compared to the post-treatment moment and IL-6 ($p = 0,007$) with higher serum concentrations at the pre-treatment time of group A when compared to the moment after treatment. Comparisons between groups A, B, and C at each time point showed differences in SDMA concentrations ($p = 0,0123$) at the time after group B (mean = $9,17 \mu\text{g} / \text{dL}$) and C (mean = $11,83 \mu\text{g} / \text{dL}$). Analyzing individually the pre and post-treatment SDMA values in each group, there was a 66.7% ($n = 8$) reduction, in group B in 42% ($n = 5$) and in group C only 25% ($n = 3$) of dogs. There was a negative correlation between erythrocytes and SDMA, leukocytes and albumin and SDMA and albumin. No correlation was observed between gingivitis and the other variables. The results of this prospective interventional study revealed associations between periodontal disease and systemic indicators of inflammatory and renal health, even in the early stages of the disease. Although no causal relationship can be confirmed by the present study, the association of oral disease with general systemic inflammatory burden and organ health highlights the need for continued research and the importance of early treatment of oral infection to prevent local and systemic irreversible damage.

Keywords: gingivitis; periodontitis; dogs; inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – Alanina aminotransferase
ANOVA - Analysis of variance
AST – Aspartato aminotransferase
AVDC – American Veterinary Dental College
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA – Comissão de Ética na Utilização de Animais
DM – Diabetes Mellitus
DP – Doença Periodontal
DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DRC – Doença Renal Crônica
EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid
EUA – Estados Unidos da América
GGT – Gama glutamiltransferase
IL-6 – Interleucina 6
IL-1 – Interleucina 1
IL-1 α – Interleucina 1 alfa
IL-1 β – Interleucina 1 beta
LPS – Lipopolissacarídeo
PAMP's – Pathogen-associated molecular patterns
PCR – Proteína C Reativa
PD – Periodontal disease
PGE2 – Prostaglandina E2
PPGCA – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
PR – Estado do Paraná
PRR's – Pattern Recognition Receptors
PUCPR - Pontifícia Universidade Católica Do Paraná
SDMA – Symmetrical dimethylarginine
TLR – Toll-like Receptor
TLR4 – Toll-like Receptor 4
TNF- α – Tumor Necrosis Factor alfa

CAPÍTULO 1

1. DOENÇA PERIODONTAL - DEFINIÇÃO E ETIOPATOGENIA

Alterações na cavidade oral são reportadas como o segundo achado de exame físico mais comum em cães, dentre as quais a doença periodontal (DP) é a afecção mais comumente diagnosticada (O'Neill et al., 2014), com prevalência em torno de 80% em animais acima de quatro anos (Lund et al., 1999; Venturini, 2006; Fernandes et al., 2012). Um estudo avaliou 445 cães de raças puras de criadouros comerciais nos EUA e identificou a DP em 86,3% desses indivíduos (Stella et al., 2018). No estudo de O'Neill e colaboradores (2014) na Inglaterra, a prevalência encontrada foi de 9,3%. Em contrapartida, em uma população de cães na República Tcheca, 60% dos animais apresentaram a doença (Kyllar e Witter, 2005). Embora as estimativas de prevalência variem entre os estudos, a DP é uma das principais afecções que afetam os cães. Essas variações dependem da população estudada e especialmente se o diagnóstico da afecção foi realizado sob anestesia, o que permite diagnóstico mais preciso (O'Neill et al., 2019; Wallis et al., 2019).

A DP é caracterizada pela inflamação e infecção do periodonto (Figura 1), comprometendo a gengiva, o ligamento periodontal, o cemento e o osso alveolar. O acometimento desses elementos ocorre progressivamente, culminando com destruição óssea alveolar e perda do elemento dental (Niemi, 2013).

O primeiro sinal da DP é a gengivite, identificada por hiperemia, edema e ulceração ou sangramento espontâneo da gengiva. É decorrente da resposta inflamatória do tecido às bactérias periodontopatogênicas presentes na placa dentária. Se esse biofilme bacteriano não é removido e acumula-se no sulco gengival, há a ação de mediadores inflamatórios e infiltração de polimorfonucleares. Com a cronicidade da doença infecto-inflamatória, o epitélio gengival é destruído pelo infiltrado celular inflamatório e pelas bactérias e seus subprodutos, tais como colagenases, hialuronidases, proteases e endotoxinas. Estes elementos levam à vulnerabilidade dos tecidos, perpetuando a infecção até alcançar os demais sítios do periodonto (Wolf et al., 2005; Harvey, 2005; Bellows et al.,

2019).

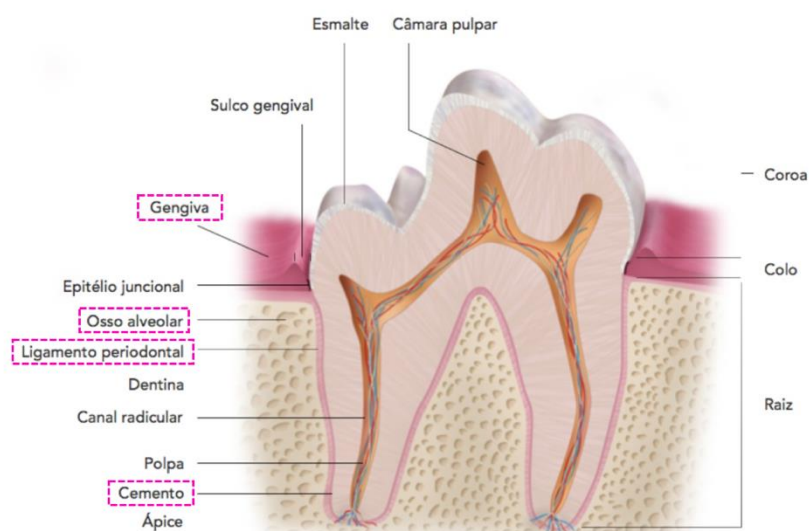


Figura 1: Representação esquemática do primeiro molar inferior de um cão adulto, com os elementos do periodonto destacados. Nota-se que o osso alveolar dá suporte e fornece o arcabouço para a fixação da raiz dentária, por intermédio da ligação entre osso alveolar e cimento, pelas fibras do ligamento periodontal. Fonte: Adaptado de Baia, 2018.

Em seres humanos existem diversas classificações propostas, considerando o tipo e a severidade da periodontite. A classificação mais utilizada é de 1999 (Hinrichs e Novak, 2012), porém em 2017 um encontro mundial de especialistas, sugeriu adequações a essa classificação (Tonetti et al., 2018). De forma geral, quanto ao tipo é classificada em periodontite necrosante, crônica, agressiva e periodontite com manifestação de doenças sistêmicas. O tipo de periodontite que se assemelha àquela frequentemente encontrada nos cães e gatos, é a forma crônica, que em seres humanos é classificada em discreta, moderada e severa, com base na quantidade em milímetros da perda de inserção gengival. Há ainda, a classificação em localizada e generalizada, sendo esta quando mais de 30% dos sítios estão afetados (Hinrichs e Novak, 2012; Tonetti et al., 2018).

Em cães, a classificação recomendada pelo Colégio Americano de Odontologia Veterinária orienta que cada elemento dentário seja avaliado e classificado a partir de quatro diferentes estágios de evolução, de acordo com suas características clínicas e radiográficas (AVDC, 2018). Essa classificação foi reiterada no último consenso de especialistas (Bellows et al., 2019), em que o primeiro estágio se caracteriza apenas por gengivite sem migração do epitélio

juncional, mantendo preservada a margem óssea alveolar em sua altura e arquitetura. O segundo estágio caracteriza a periodontite inicial, com perda menor que 25% do nível clínico de inserção, ou, no máximo, exposição de furca estágio 1 no envolvimento de dentes multirradiculares. Neste estágio, há sinais radiográficos iniciais de periodontite. A perda clínica de inserção é menor que 25% quando mensurada com o uso da sonda periodontal ou determinação radiográfica da distância da margem alveolar até a junção amelocementária, relativa ao comprimento da raiz avaliada. O terceiro estágio, periodontite moderada, apresenta entre 25 e 50% de perda clínica de inserção, mensurada a partir do uso clínico da sonda periodontal ou determinação radiográfica da distância da margem alveolar até a junção amelocementária, em relação ao comprimento da raiz avaliada, ou apresenta exposição de furca estágio 2 em dentes multirradiculares. O quarto estágio, periodontite avançada, apresenta perda clínica de inserção maior que 50%, mensurada a partir do uso clínico da sonda periodontal, determinação radiográfica da distância da margem alveolar até a junção amelocementária em relação ao comprimento da raiz avaliada, ou envolvimento de exposição de furca estágio 3 em dentes multirradiculares (Figuras 2 e 3).

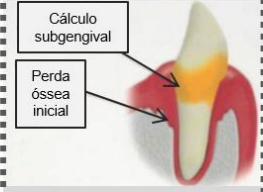
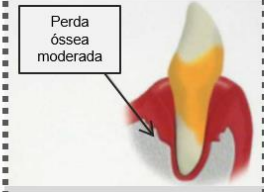
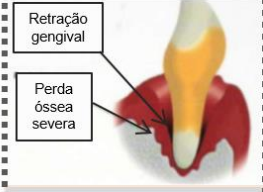
ESTÁGIO 1	ESTÁGIO 2	ESTÁGIO 3	ESTÁGIO 4
Gengivite.	Além da gengivite, há retração ou hiperplasia gengival, com formação de bolsa periodontal e início de perda óssea, com exposição de furca estágio 1 nos dentes multirradiculares.	Além da gengivite, apresenta entre 25 e 50% de perda clínica de inserção e/ou exposição de furca estágio 2 em dentes multirradiculares.	Além da gengivite, apresenta perda clínica de inserção maior que 50% e/ou exposição de furca estágio 3 em dentes multirradiculares, pode evoluir para perda do dente.
			
Não há perda óssea	Perda óssea < 25 %	Perda óssea de 30 - 50 %	Perda óssea > 50 %
			
Sulco gengival < 1 - 2 mm.	Sulco gengival pode medir até 5 mm.	Sulco gengival pode medir até 7 mm.	Sulco gengival pode ultrapassar os 7 mm.

Figura 2: Classificação da doença periodontal em cães, com os aspectos clínicos que as distinguem. Adaptado de Bellows (2004).

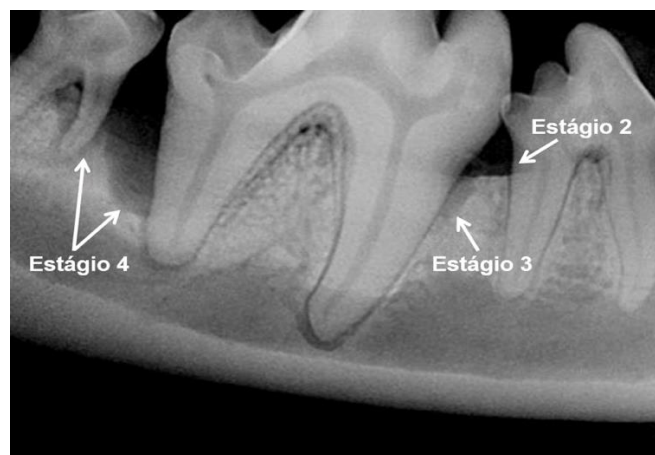


Figura 3: Alterações radiográficas relacionadas à perda óssea, vistas nos estágios 2, 3 e 4 da doença periodontal em terceiro e quarto pré-molares e primeiro molar inferior de cão. Adaptado de Bellows (2013).

O fator determinante para o início da doença é a presença de placa bacteriana (biofilme bacteriano) na superfície gengivodentária. Postula-se que antígenos específicos ou enzimas produzidas pelas bactérias no biofilme da

placa, especialmente subgengival, ativam a resposta inflamatória do hospedeiro, o que faz com que as estruturas do periodonto, especialmente ligamentos e ossos que sustentam o dente se tornem inflamados e progressivamente destruídos (Niemiec, 2013; Greene, 2015; Bellows et al., 2019).

Para que esta placa cause danos aos tecidos moles é necessário que o acúmulo de seus constituintes seja contínuo e com tendência à organização. Após o período de organização da placa, que varia de 24 a 48 horas, inicia-se a inflamação dos tecidos envolvidos (Harvey e Emily, 1993; Gioso, 2007; Preshaw e Taylor, 2012), no entanto a DP resulta de uma complexa interação entre o biofilme subgengival e eventos imunoinflamatórios do hospedeiro que se desenvolvem nos tecidos periodontais, em resposta ao desafio apresentado pelas bactérias (Preshaw e Taylor, 2012). Em humanos estão bem caracterizados os fatores causais, relacionados à susceptibilidade do hospedeiro, como comportamentais, ambientais, sistêmicos e genéticos, consagrando a natureza multifatorial da doença (Weildlich, 2001; Preshaw e Taylor, 2012). Além desses fatores, outros podem influenciar na progressão e na gravidade final da DP em cães, como predisposição racial, má oclusão, hábitos de mastigação, saúde sistêmica e irritantes locais (Bellows et al., 2019).

Os efeitos patogênicos da placa bacteriana são exacerbados pela precipitação de sais minerais, como o carbonato de cálcio e o fosfato de cálcio provenientes da saliva. Estes formam o cálculo dentário, que se localiza supra e/ou subgengivalmente (Harvey e Emily, 1993; Harvey, 1998; Niemiec, 2008). A placa e o cálculo podem conter acima de 10^{11} bactérias por grama (Niemiec, 2008).

A microbiota oral e os estágios de desenvolvimento da placa em seres humanos já estão bem caracterizados, porém, até recentemente, estudos sobre a microbiota bucal canina eram limitados, pois os métodos baseados em cultura não permitiam a detecção de certas espécies (Elliott et al., 2005; Hardham et al., 2005; Dahlén et al., 2012). A partir de 2012, com o uso do sequenciamento genético estudos caracterizaram tanto a placa bacteriana inicial na DP de cães (Dewhirst et al., 2012; Davis et al., 2013; Holcombe et al., 2014). Com a evolução desses estudos foi possível concluir que há pouca semelhança com o perfil bacteriano encontrado na DP em seres humanos, portanto o conhecimento

sobre a natureza da formação de placas nessa espécie não pode ser plenamente adotado para cães.

Em estudo mais consistente, Davis et al. (2013) analisaram amostras de 223 cães (72 com gengiva saudável, 77 com gengivite e 74 com periodontite leve) utilizando 454-pirosequenciamento para identificar espécies bacterianas associadas à saúde e a DP precoce. Segundo esses autores, as espécies mais abundantes com o periodonto hígido foram *Porphyromonas cangingivalis*, *Moraxella* sp., *Bergeyella zoohelcum*, *Neisseria shayeganii*, *Pasteurellaceae* sp., *Capnocytophaga* sp. e *Stenotrophomonas* sp. Em contraste, na periodontite leve houve uma proporção muito maior de espécies da classe *Clostridia*, além de *Peptostreptococcaceae* spp., *Lachnospiraceae* sp., *Peptococcus* sp. e *Corynebacterium canis*.

Diante desse cenário infeccioso, a inflamação é fator determinante na patogenia da doença frente aos fatores de virulência microbiana. Esses microrganismos são capazes de sintetizar produtos (p. ex., collagenase, hialuronidase, protease, condroitina sulfatase e endotoxina) que causam danos às células do epitélio e do tecido conjuntivo, assim como os constituintes intercelulares, como o colágeno, substância fundamental e o glicocálice (Fiorellini et al., 2012).

Inicialmente a gengivite apresenta-se como a inflamação do periodonto de proteção, decorrente do acúmulo de biofilme supragengival e que não leva à destruição tecidual. Diz-se que a gengivite é uma resposta universal do periodonto de proteção ao acúmulo do biofilme, pois todo indivíduo que apresentar biofilme supragengival acumulado por período de tempo que exceda a capacidade de equilíbrio entre biofilme e hospedeiro, irá desenvolver inflamação gengival (Fiorellini et al., 2012; Niemiec, 2013).

Classicamente a resposta inflamatória na DP tem sido caracterizada como aguda e crônica. A inflamação aguda caracteriza-se por ser de curta duração, apresentar predomínio de neutrófilos e exibir fenômenos vasculares e exsudativos intensos. Considera-se gengivite crônica, duas a três semanas após o acúmulo de placa. Essa inflamação crônica possui longa duração e é mais específica, com predominância de plasmócitos e linfócitos B e com provável formação de pequena bolsa gengival, exibindo fenômenos mais destrutivos e regenerativos do que o processo agudo (Martins e Martins, 2007; Fiorellini et al.,

2012).

A persistência da infecção bacteriana que ocorre na DP leva à falta de distinção no que se refere ao estado inflamatório crônico ou agudo. Desta forma, a resposta do hospedeiro nessa afecção vem sendo dividida em resposta imune inata, com características semelhantes à inflamação aguda e resposta imune adaptativa, semelhante a uma inflamação crônica. Partindo-se de conceitos evolutivos, a resposta inata antecede a adaptativa. No momento em que patógenos específicos superam os elementos de defesa inata, permanecendo no local por mais tempo, estabelece-se a resposta adaptativa (Martins e Martins, 2007).

Embora os mecanismos de defesa que atuam na imunidade inata e na adaptativa sejam semelhantes, encontram-se amplificados, direcionados e potencializados na resposta adaptativa (Dixon et al., 2004; Seymour e Taylor, 2004). A histologia demonstra que na maior parte dos estágios da DP há comunicação cruzada entre os elementos celulares e bioquímicos da resposta inata e da imunidade adaptativa, sendo, portanto, muito difícil separar e individualizar o impacto de cada uma na patogênese da DP (Martins e Martins, 2007).

Se o antígeno microbiano não for removido haverá a contínua ativação dos neutrófilos e macrófagos fazendo com que estas células liberem mediadores químicos que ativam o recrutamento da resposta imune adaptativa por levarem à diferenciação (formação e maturação) e migração de células T. A resposta imune adaptativa está sob o controle das células T, as quais regulam a diferenciação das células B, dos plasmócitos e a produção de anticorpos. Inicialmente são visualizados mais linfócitos T, poucos linfócitos B e raros plasmócitos. Com o aumento do exsudato, nota-se a presença de maior quantidade de imunoglobulinas séricas, complemento e fibrinogênio. No tecido conjuntivo local nota-se degeneração dos fibroblastos e da matriz extracelular (perda de colágeno) (Dixon et al., 2004; Seymour e Taylor, 2004).

O progresso da doença é devido a combinação de fatores, incluindo a presença de bactérias periodontopatogênicas, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, metaloproteinases da matriz e prostaglandinas, e baixos níveis de citocinas inibidoras da inflamação (Seymour e Taylor, 2004; Kurgan e Kantarci, 2017)

A partir da formação dessa bolsa gengival, a cascata de eventos tem início com a presença das bactérias dentro do sulco gengival e com a liberação de enzimas e toxinas bacterianas (Niemiec, 2008). Esses produtos induzem uma atividade proteolítica dos tecidos (Papadimitriou et al., 2006) e a produção de mediadores inflamatórios locais, como as interleucinas 1 (IL-1 α e β) e 6 (IL-6), a prostaglandina E2 (PGE2) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Gurgel et al., 2004; Buttke et al., 2005). Estes mediadores, além dos leucócitos, migram para fora dos tecidos (espaço periodontal) devido ao aumento da permeabilidade vascular, aumentando o espaço entre as células epiteliais creviculares. Além da fagocitose, os leucócitos também liberam enzimas para destruir as bactérias, contribuindo para o agravamento da inflamação (Niemiec, 2008). Desta forma, ocorre aumento da atividade osteoclástica e inibição da função osteoblástica, levando à destruição do tecido conjuntivo, reabsorção óssea e perda de inserção do epitélio juncional da gengiva (Cleland, 2001; Gurgel et al., 2004).

Essas interações entre patógeno e hospedeiro ocorrem pela capacidade do hospedeiro em reconhecer substâncias microbianas, como ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos de parede celular como, por exemplo, lipopolissacarídeos (LPS) e carboidratos. Tais substâncias são classificadas como Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e são responsáveis por caracterizar patógenos e estimular a imunidade inata (Kurgan e Kantarci, 2017). Este reconhecimento se dá a partir de um grupo de moléculas presentes na superfície de fagócitos estrategicamente localizados na fase de reconhecimento inicial de patógenos microbianos. Este grupo é chamado de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) e, dentre eles, destacam-se os receptores do tipo *Toll* (TLR) (Akira e Takeda, 2004). Quando estes receptores são excessivamente ativados ou inadequadamente controlados, contribuem para o desenvolvimento de doenças crônicas inflamatórias (Hajishengallis, 2010).

Células epiteliais da gengiva humana expressam receptores do tipo *Toll* 2, 3, 4, 5, 6 e 9, essenciais para manutenção da saúde periodontal. Quando a barreira epitelial é violada por patógenos e seus produtos citotóxicos, também há ativação destes receptores presentes em células como fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos, resultando no acúmulo de citocinas que também contribuem para a destruição do tecido periodontal (Kurgan e Kantarci, 2017).

Bactérias gram-negativas, presentes em maior quantidade na periodontite, possuem LPS como seu maior fator de virulência. Receptores do tipo *Toll* 4 (TLR4) ligam-se a esta substância e, por esta razão, são considerados os receptores mais importantes para o desenvolvimento da periodontite (Kurgan e Kantarci, 2017).

Deste modo, se a DP não for corretamente controlada, haverá progressiva destruição tecidual do periodonto devido à estimulação exacerbada destes receptores, que aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias e estimulam, continuamente, a resposta inflamatória (Hans e Hans, 2011; Kurgan e Kantarci, 2017). Quanto mais intensa e longa a inflamação gengival, maior será a resposta inflamatória sistêmica gerada pelo animal e maiores serão os danos teciduais e orgânicos (Kouki et al., 2013).

2. CONSEQUÊNCIAS SISTÊMICAS DA DOENÇA PERIODONTAL

Os processos imunoinflamatórios que se desenvolvem nos tecidos periodontais, em resposta à presença do biofilme subgengival, são protetores por intenção, mas resultam em dano tecidual por aumentarem a permeabilidade vascular dos tecidos periodontais, o que promove a entrada de bactérias na corrente sanguínea. E a partir dessa resposta imunoinflamatória do hospedeiro, é possível observar as principais evidências do impacto da DP na saúde sistêmica de seres humanos (Loos, 2005; Fiorellini et al, 2012; Borgnakke, 2015).

As primeiras suspeitas de que a infecção oral poderia causar alterações sistêmicas foram do médico britânico William Hunter em 1900, porém sem evidência científica à época, o que fez com que, em meados de 1940 fossem abandonadas, pois mesmo os pacientes passando por extrações dentárias não eliminavam os distúrbios sistêmicos infecciosos associados. No entanto, com essas observações iniciais, esse médico contribuiu consideravelmente para os estudos subsequentes relacionados à imunologia e microbiologia (Mealey e Klokkevold, 2012). O conhecimento da patogênese da DP evoluiu acentuadamente nos últimos 30 anos, dando início a uma nova fase de entendimento e de evidências sobre o impacto da infecção oral na saúde geral de seres humanos (Beck et al., 2019). O termo

atualmente utilizado para o estudo de doenças e condições associadas à periodontite é Medicina Periodontal, com expressivo crescimento das pesquisas a partir do ano 2000. Uma revisão sistemática de ensaios clínicos sobre o tema indicou 57 condições distintas potencialmente relacionadas à DP (Monsarrat et al., 2016). Mesmo com estudos extensos e recentes, os mecanismos etiopatogênicos pelos quais a DP afeta a saúde sistêmica ainda estão sendo elucidados (Beck et al., 2019).

Acredita-se que coexistam três mecanismos: (1) Bacteremia – invasão bacteriana do endotélio, indução da formação de placa aterosclerótica seguida de agregação plaquetária; (2) Resposta inflamatória – liberação de mediadores inflamatórios como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) que influenciarão a produção de proteínas inflamatórias de fase aguda, como proteína C-reativa (PCR), amiloide A e fibrinogênio; (3) Resposta imune – formação de anticorpos e complexos imunes às bactérias e seus subprodutos como LPS. Tanto a colonização bacteriana, propiciada pela bacteremia, o depósito de imunocomplexos ou anticorpos, quanto o depósito de proteínas inflamatórias como amiloide A e fibrinogênio, podem ocorrer em diversos tecidos como: artérias, miocárdio, cérebro, rins, fígado, pâncreas, articulações e cólon/reto (Figura 4) (Borgnakke, 2015).

Uma revisão selecionou estudos marcantes sobre medicina periodontal publicados nos últimos 100 anos, com foco particular nos efeitos da DP em três condições patológicas específicas e mais prevalentes: doença cardiovascular, diabetes mellitus e resultados adversos da gravidez mostrando o quão consagrado está o conhecimento em seres humanos nessas situações (Beck et al., 2019). Recentemente, duas publicações demonstraram a relação entre DP e doença pulmonar obstrutiva crônica (Takeuchi et al., 2019) e câncer oral (Shin et al., 2019). Saito e colaboradores (2001) identificaram que adultos com índice elevado de massa corporal apresentaram risco aumentado de desenvolver DP, se comparado a indivíduos mais magros.

Na década de 1990, pesquisas médicas sobre inflamação sistêmica demonstraram potenciais interações entre periodontite e doença cardiovascular, ambas consideradas como condições inflamatórias. Indivíduos com proteína C-reativa cronicamente elevada apresentaram risco

se comparado com os cães com a doença menos severa (DeBowes et al., 1996; Pavlica et al., 2008).

Glickman et al. (2009) em estudo retrospectivo de prontuários de 59.296 cães, divididos em graus 1, 2 e 3 de DP, detectaram associações significativas entre a gravidade da infecção oral e o risco subsequente de doenças cardiovasculares, como endocardite e cardiomiopatia. Sugeriram que a inflamação crônica decorrente de infecção bacteriana é o mecanismo pelo qual ocorre doença sistêmica. No entanto, essa pesquisa foi contestada por especialistas, pois não foi adotado um padrão de diagnóstico de doenças cardíacas, faltando dados relacionados à ecocardiograma e necropsia, estes fundamentais no estabelecimento da endocardite, por exemplo (Peddle et al., 2009).

No estudo de DeBowes et al. (1996), a fibrose focal e as discretas alterações degenerativas encontradas nos miócitos são compatíveis com episódios passados de insulto isquêmico ou inflamatório leve. Apesar dos resultados dos estudos indicarem relação significativa entre doença periodontal e alterações morfológicas nos órgãos, sugerindo consequências sistêmicas da afecção oral, não há estudo que estabeleça relação direta da DP e mudanças patológicas de órgãos em cães.

Peddle et al., (2009) objetivaram identificar fatores de risco associados ao desenvolvimento de endocardite bacteriana em 76 cães, determinando se a DP e os procedimentos cirúrgicos (orais e não orais) estavam associados ao quadro, baseado em ecocardiograma e necropsia para diagnóstico da afecção valvar. Os resultados não forneceram nenhuma evidência de associação entre endocardite bacteriana e a realização de procedimentos. Até o momento não há evidências científicas da relação direta entre infecção oral e distúrbios cardiovasculares nessa espécie.

O artigo de Glickman (1946) foi um dos primeiros elos entre DP e diabetes mellitus (DM) e desde então inúmeros estudos evidenciaram que essas doenças apresentam relação bidirecional, ou seja, o DM favorece o desenvolvimento e a gravidade da DP, e o componente inflamatório gerado pela DP pode afetar negativamente o controle metabólico do DM. Além disso, foi observada maior frequência de complicações diabéticas (proteínúria, acidente vascular cerebral, ataque isquêmico transitório, angina, infarto do

miocárdio e claudicação intermitente) entre pacientes com diabetes e periodontite grave (Thorstensson, 1996; Morita et al., 2010; D'Aiuto et al., 2018). Isso ocorre porque os mediadores inflamatórios sistêmicos em pacientes com DP causam resistência aumentada à insulina, e consequentemente aumento da glicemia (Borgnakke et al., 2013). Apesar desse amplo conhecimento da relação entre essas duas afecções em seres humanos, a clínica veterinária carece de pesquisas. Van Nice (2006) relatou um caso de cão diabético com focos de abscessos periapicais devido fraturas dentárias e hiperglicemia refratária, com melhora após tratamento da infecção, e Pöppel et al. (2014) relataram que após tratamento periodontal de uma fêmea canina diabética, houve melhora do controle glicêmico.

Outros dois estudos identificaram que cães com DP em estágios mais avançados apresentaram, após tratamento, redução da concentração de proteína C-reativa (PCR) (Rawlinson et al., 2011; Simões, 2016). Kouki e colaboradores (2013) detectaram correlação positiva entre gengivite e PCR, sugerindo inflamação sistêmica a partir da infecção oral. Também observaram que o hematócrito era inferior nos pacientes com doença periodontal. Nesses últimos estudos não foram avaliadas citocinas pró-inflamatórias. O único estudo em cães com DP que avaliou citocinas pró-inflamatórias identificou aumento da IL-6 nos animais, quando comparado ao grupo controle tratado (Cardoso, 2012).

Ioannidou et al. (2012) identificaram maiores índices de PCR em pacientes humanos com doença renal crônica (DRC) e DP se comparado ao grupo com DRC e sem DP. Quando a extensão da periodontite foi utilizada como uma das variáveis independentes, mostrou-se forte associação entre o grau de periodontite e os níveis séricos de PCR, sugerindo que a infecção oral pode afetar o estado inflamatório sistêmico desses indivíduos.

Segundo Fisher e Taylor (2009), adultos com DP têm 4,5 vezes mais chance de apresentar DRC. Há estudos que indicam haver correlação bidirecional entre a DP e a DRC, ou seja, a existência de uma das afecções favorece o surgimento ou a piora da outra (Borgnakke, 2015; Fernandes, 2017; Pimentel, 2018). Isso ocorre devido ao aumento da produção de mediadores inflamatórios proporcionada pela periodontite, que estimula o sistema imunológico e também eleva a produção da PCR, ocasionando a

glomerulonefrite. Além desse mecanismo, as lesões renais podem ser causadas diretamente pela bacteremia e endotoxinas produzidas pelas bactérias, pois os patógenos orais migram pela corrente sanguínea e podem causar pielonefrite e nefrite intersticial (DeBowes et al., 1996; Fernandes, 2017).

Em cães, Glickman et al. (2009), em estudo longitudinal retrospectivo, com análise de prontuários médicos de 415.971 pacientes atendidos em mais de 750 hospitais americanos entre janeiro de 2002 a dezembro de 2008 e acompanhados por período mínimo de 336 dias, observaram que pacientes com DP apresentavam maior incidência de DRC do que aqueles que não apresentavam a afeção, e que quanto mais avançado o estágio da DP, maiores as concentrações séricas de creatinina, um marcador indireto da taxa de filtração glomerular.

Recentemente, houve validação de um marcador precoce da taxa de filtração glomerular em cães, denominado dimetilarginina simétrica (SDMA). Essa molécula é liberada e detectada na circulação quando, aproximadamente, 25% da função renal estiver comprometida, enquanto o aumento de creatinina somente é detectado quando mais de 66 a 75% dos néfrons passam a ser afuncionais (DiBartola, 2000; Nabity et al., 2015; Pelander et al., 2018).

O objetivo do tratamento periodontal é melhorar a qualidade de vida do paciente, a partir do combate à infecção, preservando dentes funcionais circundados por periodonto saudável ou extraíndo aqueles com as estruturas periodontais moderada ou severamente comprometidas. Além disso, a intervenção periodontal bem-sucedida pode não apenas reduzir a DP e prolongar a sobrevida do dente, mas também prevenir o início ou a progressão de várias doenças sistêmicas crônicas (Borgnakke, 2015).

Há escassez de estudos na medicina veterinária sobre a relação de DP e doenças sistêmicas. Diante do entendimento de que bactérias presentes no biofilme podem induzir a inflamação, com liberação de mediadores inflamatórios e também causar bacteremia, há necessidade de pesquisas contínuas sobre o tema.

3. OBJETIVOS

- Avaliar em cães com diferentes graus de DP antes e após o tratamento periodontal:
 - Hemograma (eritrócitos, hematócrito, leucócitos)
 - Proteinograma (proteína total, albumina e globulinas)
 - Presença de degeneração e necrose hepatocelular (ALT)
 - Glicemia
 - Taxa de filtração glomerular (creatinina e SDMA)

CAPÍTULO 2

Artigo científico a ser submetido para publicação no periódico

Research in Veterinary Science

Artigo científico

Avaliação de indicadores sistêmicos de saúde antes e após o tratamento da doença periodontal em cães

Villanova-Bacchi R[§], Mosko PRE[†], Carvalho NS[‡], Engracia Filho JR[#]

* Professor de Medicina Veterinária, Universidade Positivo, Curitiba, Paraná, Brasil.

† Professor de Medicina Veterinária, Universidade Positivo, Curitiba, Paraná, Brasil.

‡ Médica Veterinária Autônoma, Hospital Veterinário Clinivet, Curitiba, Paraná, Brasil.

Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

§Autor para correspondência: E-mail: rebecca.villanova@up.edu.br

Resumo

Objetivo: Poucos estudos têm sido realizados avaliando o impacto da doença periodontal sobre a saúde sistêmica em cães. O objetivo do estudo foi verificar se cães adultos com diferentes graus de DP apresentam alteração em indicadores sistêmicos de saúde, além de avaliar o efeito do tratamento periodontal sobre esses indicadores.

Metodologia: Foram selecionados 36 cães com doença periodontal em estágios 1, 2, 3 e 4 sem comorbidades, com média de idade de 6,4 anos e peso variando de 1,7kg à 39kg (média 9,9kg) atendidos no Hospital Veterinário Clinivet, Curitiba – PR – Brasil. Para análise dos resultados, os animais foram reclassificados em grupos A, B e C, sendo que o grupo B foi composto pelos animais com doença periodontal nos estágios 2 e 3. Todos os animais foram submetidos ao tratamento periodontal. Foi realizada a comparação das médias nos momentos pré e pós-operatório em cada grupo e entre os grupos para as variáveis: eritrócitos, hematócrito, leucócitos, albumina, globulinas, creatinina, SDMA, ALT e glicemia e a comparação das medianas para a IL-6. A correlação entre as variáveis eritrócitos, hematócrito, leucócitos, glicemia, albumina, globulinas, ALT, creatinina, SDMA, IL-6, idade e peso foram feitas pelo teste de Pearson ($p \leq 0,05$). A correlação entre gengivite e as demais variáveis foi feita pelo teste de Spearman ($p \leq 0,05$).

Resultados: A maioria dos animais apresentou gengivite 2 ($n = 27$). As análises realizadas entre os momentos pré e pós-tratamento periodontal em cada grupo, demonstraram haver diferença nos valores de eritrócitos ($p = 0,034$), estando mais baixo no momento pré do grupo C em comparação com o momento pós-tratamento; albumina ($p = 0,010$), com valores séricos inferiores no momento pré tratamento do grupo C se comparado ao momento pós e a IL-6 ($p = 0,007$) com concentrações séricas mais elevadas no momento pré do grupo A, quando comparada ao momento pós-tratamento. As comparações entre os grupos A, B e C em cada momento demonstraram diferença nas concentrações de SDMA ($p = 0,0123$), no momento pós entre os grupos B e C. Analisando individualmente os valores do SDMA pré e pós-

tratamento em cada grupo, houve redução do SDMA em 66,7 % (n= 8) dos animais, no grupo B em 42% (n= 5) deles e no grupo C em apenas 25% (n= 3) dos cães. Houve correlação negativa entre eritrócitos e SDMA, leucócitos e albumina e SDMA e albumina. Quando a análise foi feita em cada grupo, somente houve correlação no grupo A, sendo negativa entre eritrócitos e SDMA, leucócitos e albumina e SDMA e albumina, e correlação positiva entre eritrócitos e albumina. Não foi observada correlação entre gengivite e as demais variáveis.

Relevância clínica: Os resultados deste estudo revelaram associações entre a DP e alterações sistêmicas sob aspecto inflamatório e renal, mesmo em estágios iniciais da doença. Embora nenhuma relação causal possa ser comprovada pelo presente estudo, a associação da DP à carga inflamatória sistêmica geral e à saúde de órgãos destaca a necessidade de pesquisa continuada e a importância do tratamento precoce da infecção oral para evitar danos irreversíveis locais e sistêmicos.

PALAVRAS-CHAVE: gengivite; periodontite; cão; inflamação.

Introdução

A doença periodontal (DP) tem alta prevalência em cães, estando presente em 80% dos animais acima de quatro anos (Lund et al., 1999; Fernandes et al., 2012; Stella et al., 2018; O'Neill et al., 2019). O primeiro sinal da DP é a gengivite, identificada por hiperemia, edema e ulceração ou sangramento espontâneo da gengiva. Se a placa bacteriana não é removida, a doença

infecto-inflamatória crônica, o epitélio gengival é destruído pelo infiltrado celular inflamatório e pelas bactérias e seus subprodutos, tais como collagenase, hialuronidase, protease, condroitina sulfatase e endotoxina, causando vulnerabilidade dos tecidos, com perpetuação até os demais elementos do periodonto: ligamento periodontal, cemento e osso alveolar (Wolf et al., 2005; Harvey, 2005; Bellows et al., 2019).

Para que haja dano tecidual e progressão da doença, há complexa interação entre o biofilme subgengival e os eventos imunoinflamatórios do hospedeiro que se desenvolvem nos tecidos periodontais, em resposta ao desafio apresentado pelas bactérias (Preshaw e Taylor 2012). Os fatores que podem influenciar na progressão e na gravidade da DP são predisposição racial, má oclusão, hábitos de mastigação e de higiene bucal, dieta, idade, estresse e doença sistêmica (Wolf et al., 2005; Bellows et al., 2019).

Os mediadores inflamatórios produzidos localmente, como interleucinas 1 (IL-1 α e β) e 6 (IL-6), prostaglandina E2 (PGE2) e fator de necrose tumoral (TNF- α), além dos leucócitos e subprodutos bacterianos, especialmente lipopolissacarídeos migram para fora dos tecidos (espaço periodontal) devido ao aumento da permeabilidade vascular (Niemić, 2008), levando à destruição do tecido conjuntivo, reabsorção óssea e perda de inserção do epitélio juncional da gengiva (Cleland, 2000; Gurgel et al., 2004).

Todo esse fenômeno infecto-inflamatório local, quanto mais intenso e prolongado for, maior será a resposta inflamatória sistêmica gerada pelo animal e maiores serão os danos teciduais e orgânicos (Kouki et al., 2013). Os mecanismos propostos para as alterações sistêmicas da DP são a bacteremia, a liberação dos mediadores inflamatórios e a produção de proteínas de fase

aguda, como proteína C-reativa, além da resposta imune, com a formação e deposição de imunocomplexos nos tecidos (Borgnakke, 2015).

Os últimos 30 anos foram marcados pelas crescentes pesquisas sobre a medicina periodontal em seres humanos, termo usado para se referir ao impacto da infecção e inflamação oral na saúde geral (Beck et al., 2019). Já foram referidas 57 condições distintas potencialmente relacionadas à DP (Monsarrat et al., 2016), sendo que as já consagradas e mais frequentes são doença cardiovascular, diabetes mellitus e resultados adversos da gravidez (Beck et al., 2019). Recentemente, duas publicações demonstraram a relação entre DP e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Takeuchi et al., 2019) e câncer oral (Shin et al., 2019).

Poucas pesquisas têm sido realizadas sobre o tema em cães. Os primeiros estudos foram realizados em cadáveres e revelaram que animais com DP grave a moderada apresentavam mais alterações microscópicas em miocárdio, valva mitral, rins (glomérulo e interstício), e parênquima hepático, se comparado com os cães com a DP menos severa (DeBowes et al., 1996; Pavlica et al., 2008). Pesquisas subsequentes detectaram associações significativas entre a gravidade da infecção oral e o risco aumentado de doenças cardiovasculares, como endocardite e cardiomiopatia (Glickman et al., 2009). Em contrapartida, Peddle et al. (2009) não identificaram evidência de associação entre endocardite bacteriana, a presença de DP e a realização de procedimentos cirúrgicos orais ou não orais.

Outros dois estudos identificaram que cães com DP em estágios mais avançados apresentaram, após tratamento, redução da concentração de proteína C reativa (PCR) (Rawlinson et al., 2011; Simões, 2016). Kouki e

colaboradores (2013) detectaram correlação positiva com os graus de DP e PCR, sugerindo inflamação sistêmica a partir da infecção oral. Também observaram que o hematócrito era inferior nos pacientes com DP. Um único estudo em cães avaliou citocinas pró-inflamatórias identificando aumento da IL-6 nos animais com DP, quando comparado ao grupo controle tratado (Cardoso, 2012). Sun et al. (2009) apontaram que a PCR e a IL-6 como possíveis mediadores envolvidos na associação entre doença periodontal e doenças sistêmicas em humanos. A IL-6 atua como mediadora central da resposta de fase aguda e a principal citocina pró-coagulante, pois estimula a produção e a elevação das concentrações plasmáticas de fibrinogênio, proteína amiloide sérica, e em especial, a proteína C reativa (PCR) produzidas pelo fígado (Preshaw e Taylor, 2012; Tizard, 2014).

Em seres humanos já foi demonstrado que adultos com DP têm 4,5 vezes mais chance de apresentar doença renal crônica (DRC) (Fisher e Taylor, 2009). Ioannidou et al. (2012) identificaram maiores índices de PCR em pacientes humanos com DRC e DP se comparado ao grupo com a afecção renal e sem DP, sugerindo que a infecção oral pode afetar o estado inflamatório sistêmico desses indivíduos.

DeBowes et al. (1996) identificaram em cães com DP, lesões renais na necropsia, tais como glomerulonefrite e nefrite intersticial. Nessa mesma espécie, Glickman et al. (2009), em estudo longitudinal retrospectivo de prontuários médicos de 415.971 animais, observaram que pacientes com DP apresentavam maior incidência de DRC do que aqueles que não apresentavam a afecção e que quanto mais avançado o estágio de doença periodontal, maiores as concentrações séricas de creatinina, um marcador indireto da taxa de filtração

glomerular.

A dimetilarginina simétrica (SDMA) é considerada um marcador da taxa de filtração glomerular em cães, liberada e detectada na circulação quando, aproximadamente, 25% da função renal está comprometida, enquanto o aumento de creatinina somente é detectado quando mais de 66 a 75% dos néfrons passam a ser afuncionais (DiBartola, 2000; Nabity et al., 2015; Pelander et al., 2018). A avaliação do SDMA então pode ser útil na avaliação das consequências imunoinflamatórias da DP nos rins.

Portanto o objetivo do estudo foi avaliar indicadores sistêmicos de saúde, por intermédio de valores hematológicos (eritrócitos, hematócrito, leucócitos), de proteinograma, de bioquímicos (glicemia, albumina, ALT, creatinina e SDMA) e da IL-6, de cães com diferentes graus de DP pré e pós-tratamento periodontal.

Materiais e Métodos

Comitê de ética

O estudo obteve autorização da Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) da PUCPR, sob número 01250 (Anexo 1). Foram incluídos no estudo, os animais cujos proprietários concordaram com os procedimentos e que assinaram o termo de consentimento de uso animal.

Delineamento experimental

O estudo é do tipo longitudinal, prospectivo, não aleatorizado e intervencionista.

Foram incluídos no estudo cães de diversas raças, de ambos os sexos, peso variando de 1,7kg a 39kg (média= 9,9kg e mediana= 5,6kg), idade acima de 18 meses (media= 6,4 anos e mediana= 6 anos), condição corporal eutrófica, castrados ou não e portadores de doença periodontal em estágios 1, 2, 3 e 4 atendidos no Hospital Veterinário Clinivet®, localizado em Curitiba–PR, Brasil.

Foram excluídos do estudo cães com sobrepeso ou obesos (escore corporal de 7 a 9) e com outras doenças sistêmicas concomitantes, como doenças dermatológicas, endócrinas, respiratórias, cardiovasculares, renais, hepáticas, autoimunes e neoplásicas; cães que fizeram uso de corticoides; receberam transfusão sanguínea ou passaram por algum protocolo de imunização pelo prazo de três meses antes da inclusão no projeto e no período de 30 dias após o tratamento periodontal e, cadelas em estro.

Para exclusão de comorbidades, foi avaliado o histórico do paciente, além da realização do exame físico e de exames laboratoriais de triagem: hemograma completo, glicemia, alanina aminotransferase (ALT) e creatinina.

Protocolo experimental

Os animais incluídos no projeto foram avaliados em três momentos distintos. A primeira avaliação consistiu na realização de anamnese e exame físico completos e sendo este animal um candidato (respeitando os critérios de inclusão e exclusão descritos acima) foram colhidas amostras de sangue para as análises laboratoriais. Amostras de soro foram aliquotadas e armazenadas sob congelamento a -20°C e posteriormente a -80 °C para análises futuras de albumina, globulinas, IL6 e SDMA.

O paciente selecionado foi submetido ao segundo momento de

avaliação, 7 a 15 dias após o primeiro, quando sob anestesia, foi realizada a determinação do grau de doença periodontal, seguido do tratamento periodontal, permanecendo sob observação por 8 horas após o término do procedimento.

O momento 3 ocorreu 30 dias após o tratamento periodontal (correspondente ao 37º à 45º dia após a inclusão no estudo). O objetivo neste momento foi de avaliar a evolução pós-operatória e realizar a coleta de sangue para repetição dos exames de triagem e armazenamento de alíquotas de soro para análises futuras de albumina, IL-6 e SDMA.

Coleta das amostras

Os cães foram submetidos às coletas das amostras, sob jejum alimentar de 8 a 12 horas. O sangue foi obtido da veia jugular por meios assépticos com seringas de 5 ou 10 mL e agulhas descartáveis com diâmetros variados de acordo com o porte do animal. As amostras foram acondicionadas em frascos contendo EDTA, fluoreto de sódio e em frascos com ativador de coágulo, e encaminhadas imediatamente para o Laboratório de Patologia Clínica CLINILAB®, localizado no Hospital Veterinário CLINIVET®. Alíquotas de soro foram separadas e armazenadas em frascos do tipo Eppendorff a -20°C e na sequência mantidos em temperatura de -80 °C para análises futuras tanto no momento pré-operatório como no pós-operatório (30 dias após).

Determinação da ALT, creatinina, albumina, globulinas e glicemia

As amostras foram avaliadas com uso de kits comerciais específicos e a leitura por espectrofotometria da albumina, conforme as técnicas

empregadas rotineiramente no Laboratório de Patologia Clínica CLINILAB®. Os valores de globulina foram calculados a partir do valor da proteína total diminuído do valor da albumina.

Determinação da concentração sérica de IL- 6

A quantificação da interleucina IL-6 foi realizada utilizando-se kit comercial CCYTOMAG 90K (Milliplex® / EMD Millipore®) seguindo o protocolo padrão descrito pelo fabricante.

Determinação da concentração sérica de SDMA

A avaliação da concentração sérica de SDMA foi determinada pelo método de radioimunoensaio homogêneo, realizada na IDEXX® Laboratories Brasil.

Classificação do grau da doença periodontal

Os cães selecionados foram encaminhados para tratamento periodontal cirúrgico. Durante o procedimento foi realizado o exame clínico odontológico para classificação da DP. Foi feita inspeção visual e exploração tátil das superfícies dos dentes com o auxílio de um explorador dentário. Além disso, o periodonto foi avaliado por intermédio de uma sonda periodontal e radiografia intra-oral de todos os dentes, com captação de imagem com sensor odontológico Microimagem® (FIT tamanho T1) e software específico da marca. O aparelho utilizado para emissão de Raio X Procion® (Ion 70x móvel digital). Os achados desses exames foram registrados em odontograma específico para a espécie e a DP classificada com base nos seguintes critérios (Bellows et al., 2019): Estágio 1: apenas gengivite, sem

migração do epitélio juncional, mantendo preservada a margem óssea alveolar em sua altura e arquitetura. Estágio 2: periodontite inicial, com perda menor que 25% do nível clínico de inserção, ou, no máximo, exposição de furca estágio 1 no envolvimento de dentes multirradiculares. Neste estágio, há sinais radiográficos iniciais de periodontite. A perda clínica de inserção é menor que 25% quando mensurada com o uso da sonda periodontal ou determinação radiográfica da distância da margem alveolar até a junção amelocementária, relativa ao comprimento da raiz avaliada. Estágio 3: periodontite moderada, apresenta entre 25 e 50% de perda clínica de inserção, mensurada a partir do uso clínico da sonda periodontal ou determinação radiográfica da distância da margem alveolar até a junção amelocementária, em relação ao comprimento da raiz avaliada, ou apresenta exposição de furca estágio 2 em dentes multirradiculares. Estágio 4: periodontite avançada, apresenta perda clínica de inserção maior que 50%, mensurada a partir do uso clínico da sonda periodontal, determinação radiográfica da distância da margem alveolar até a junção amelocementária em relação ao comprimento da raiz avaliada, ou envolvimento de exposição de furca estágio 3 em dentes multirradiculares.

O animal foi classificado quanto a DP nos estágios 1, 2, 3 ou 4, considerando quando pelo menos um elemento dentário já apresentava alteração compatível o grau da doença. Os animais dos estágios 2 e 3 foram, posteriormente, reclassificados em grupo B, considerando que ambos os estágios são considerados doença moderada. Dessa forma, as análises foram feitas considerando o Grupo A= estágio 1 da DP; Grupo B= estágios 2 e 3 da DP; Grupo C= estágio 4 da DP, equivalente a doença periodontal discreta, moderada e severa, conforme Cardoso (2012).

A gengivite foi pontuada em uma escala de 0 a 3, sendo 0= gengiva normal, 1= inflamação discreta (discreta alteração na cor, edema discreto e sem sangramento na sondagem), 2= inflamação moderada (eritema, edema e envidramento com sangramento à sondagem) e 3 = inflamação grave (eritema, edema ou ulceração e sangramento espontâneo) (AVDC, 2018; Bellows et al., 2019).

Tratamento periodontal

Após a classificação da DP, sempre o mesmo operador realizou o tratamento periodontal sob anestesia geral, de acordo com as alterações encontradas em cada dente, sendo que as técnicas cirúrgicas incluíram: curetagem supra e subgengival, aplainamento radicular, gengivoplastia, gengivectomia, extração dentária e flape periodontal. Todos os dentes passaram pela limpeza ultrassônica com equipamento ultra scaler Kavo® seguida por polimento com escova de Robinson e pasta abrasiva. O carter odontológico utilizado em todos os procedimentos foi da marca Kavo®.

Protocolo anestésico

O protocolo pré-anestésico utilizado consistiu na associação de dexmedetomidina 3 a 5 µg/kg e metadona 0,3 mg/kg pela via intramuscular; após 15 minutos aproximadamente, a indução foi realizada com propofol 4 mg/kg pela via intravenosa e para a manutenção anestésica, realizou-se intubação orotraqueal e oxigênio 100%, mantendo-se infusão contínua intravenosa de dexmedetomidina 2 µg/kg/h, cetamina 0,6 mg/kg/h e propofol 18 mg/kg/h. Para analgesia pós-operatória imediata, quando necessário, utilizou-se dipirona 25 mg/kg por via subcutânea associada ou não a uma

dose única de carprofeno 3mg/kg pela mesma via.

Cuidados pós-operatórios

Dependendo da extensão do tratamento periodontal e das extrações dentárias, alguns cães receberam prescrição de antimicrobiano amoxicilina com ácido clavulânico 20 mg/kg a cada 12 horas por via oral por 7 dias e como terapia analgésica dipirona 25mg/kg a cada 12 horas por via oral associada ou não com cloridrato de tramadol 2mg/kg a cada 12 horas por via oral, por no máximo, cinco dias após o procedimento odontológico. Alguns cães não necessitaram de medicação no pós-operatório. Cuidados adicionais incluíram higienização oral com digluconato de cloredixine a 0,12% a cada 12 horas por no máximo sete dias e escovação diária com pasta específica para cães.

Análise estatística

O programa estatístico utilizado foi IBM SPSS, versão 24. As comparações das médias das variáveis eritrócitos, hematócrito, leucócitos, glicemia, albumina, globulinas, ALT, creatinina e SDMA entre os grupos de doença A, B e C foram realizadas pela ANOVA Tipo III, sempre que verificada a homogeneidade de variância pelo teste de Levene. Quando rejeitada a hipótese de nulidade pela ANOVA, foi realizado o teste de Tukey, quando observada homogeneidade, caso contrário, foi utilizado o teste de Bonferroni, para minimizar o erro tipo II. Todas as avaliações foram realizadas com um nível de significância de 0,05. As comparações de médias entre os momentos pré e pós-tratamento foram realizadas pelo teste *t* de Student em par de médias ($p \leq 0,05$). Para a variável IL-6 foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney (Wilcoxon) ($p \leq 0,05$).

A correlação entre as variáveis eritrócitos, hematócrito, leucócitos, glicemia, proteína total, globulinas, albumina, ALT, creatinina, SDMA, IL6, idade e peso foram feitas pelo teste de Pearson ($p \leq 0,05$). A correlação entre gengivite e as demais variáveis foi feita pelo teste de Spearman ($p \leq 0,05$).

Resultados

Dos 41 cães selecionados inicialmente para o estudo, três foram excluídos por falta de retorno na avaliação pós-operatória, um por apresentar erliquiose e outro por desenvolver reação à picada de inseto durante o período de acompanhamento. Portanto, 36 cães foram incluídos no estudo, sendo 12 animais com DP grau 1, oito animais com DP grau 2, quatro animais com DP grau 3 e 12 animais com DP grau 4. Para as análises estatísticas, os animais dos estágios 2 e 3 foram reclassificados em grupo B. Então, as análises foram feitas considerando o Grupo A = estágio 1 da DP; Grupo B = estágios 2 e 3 da DP; Grupo C = estágio 4 da DP, equivalente à DP discreta, moderada e severa, respectivamente.

A idade dos cães variou de 1 a 12 anos (média = 6,47 anos e mediana= 6 anos) e o peso corporal variou de 1,7 kg a 39 kg (média = 9,9 kg e mediana= 5,6 kg). Houve diferença significativa entre os grupos A e C em relação ao peso (Figura 1). A distribuição das raças em cada grupo está apresentada na Tabela 1. Os escores corporais (escala de 1 a 9) variaram de 4 a 6, sendo 26 animais com escore 5, oito animais com escore 4 e dois animais com escore 6. Vinte e três cães eram fêmeas e 13 eram machos.

Tabela 1. Distribuição do número de cães conforme a raça nos grupos A, B e C.

RAÇAS	GRUPOS		
	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Bernese montain dog	1		
Boxer		1	
Bulldog		1	
Collie	1		
Golden retriever	1		
Lhasa apso	1	1	1
Pinscher			1
Poodle		1	5
Maltês	1	2	
Sem raça definida	5	4	1
Shitzu			1
Yorkshire	1	1	3
West highland white terrier		1	
Whippet	1		

Quanto ao escore de gengivite, seis animais apresentaram gengivite grau 1, 27 cães grau 2 e três indivíduos grau 3. Quando a análise foi feita dentro de cada grupo, 83% (n=10) dos cães do grupo A e C apresentaram gengivite grau 2, já no grupo B, 58% (n=7) dos animais apresentaram gengivite grau 2 (Figura 2).

Figura 1. Valores de peso (A) e idade (B) de cães com DP, pertencentes aos grupos A, B e C. *: Diferença significativa entre os grupos A e C. Valores representados em média e desvio padrão.

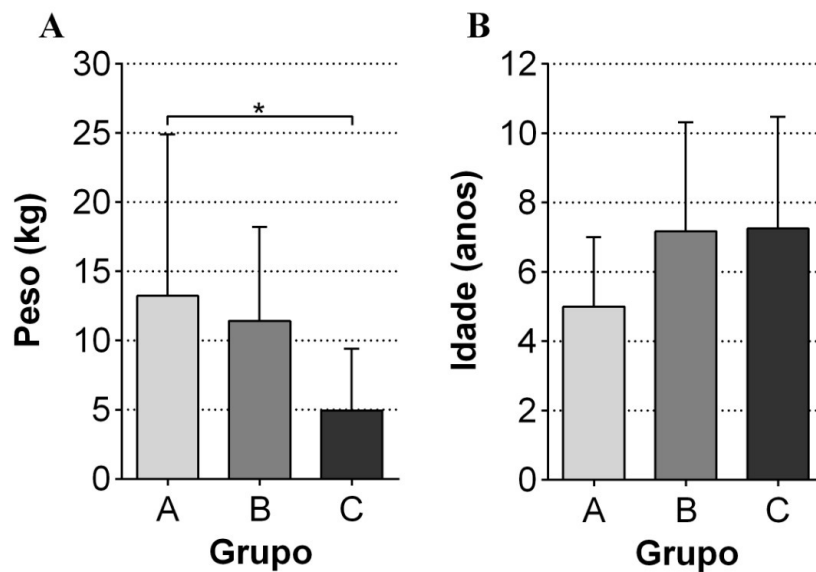
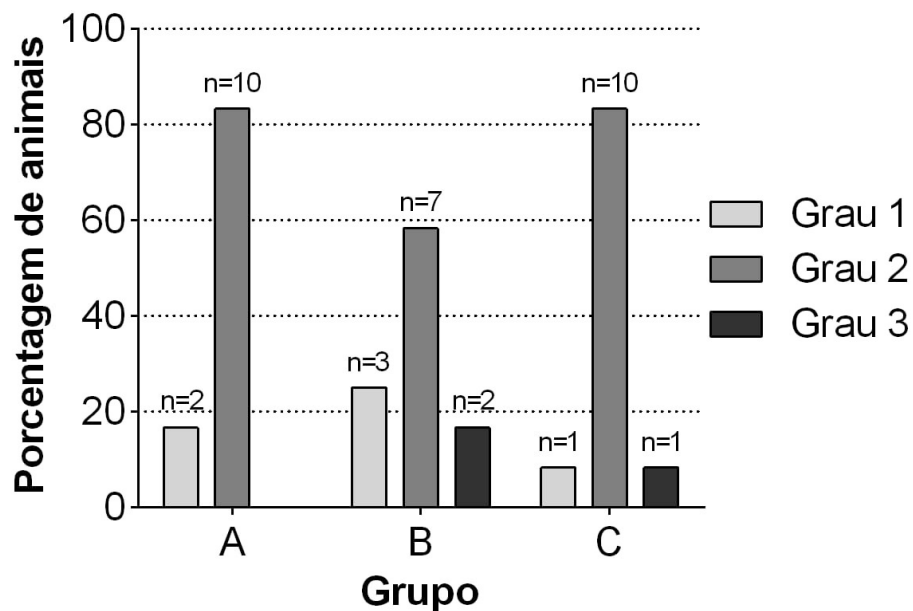


Figura 2. Número de animais com DP conforme o grau de gengivite, pertencentes aos grupos A, B e C.



As análises realizadas entre os momentos pré e pós-tratamento periodontal em cada grupo, demonstraram haver diferença nos valores de eritrócitos ($p=0,034$), estando mais baixo no momento pré do grupo C (média= $7,63 \times 10^6/\text{mm}^3$)

em comparação com o momento pós-tratamento (média= $8,08 \times 10^6/\text{mm}^3$); albumina ($p= 0,010$), com valores séricos inferiores no momento pré tratamento do grupo C (média= 47,21 g/dL) se comparado ao momento pós (média= 50,01 g/dL) e a IL-6 ($p= 0,007$) com concentrações séricas mais elevadas no momento pré do grupo A (média= 44,35 pg/mL), quando comparada ao momento pós-tratamento (média= 13,6 pg/mL). Nesse grupo todos os animais apresentaram redução dos valores de IL-6 após o tratamento, no grupo B 66,7 % dos animais ($n=8$) e no grupo C 33,3% ($n=4$) deles.

As comparações entre os grupos A, B e C em cada momento demonstraram diferença nas concentrações de SDMA ($p= 0,0123$), no momento pós-tratamento entre os grupos B (média= 9,17 $\mu\text{g/dL}$) e C (média= 11,83 $\mu\text{g/dL}$). No entanto, observando os indivíduos de cada grupo entre os momentos pré e pós-operatório, mesmo sem diferença significativa, notou-se que no grupo A houve redução do SDMA em 66,7 % ($n= 8$) dos animais, no grupo B em 42% ($n= 5$) deles e no grupo C em apenas 25% ($n= 3$) dos cães.

As variáveis hematócrito, leucócitos, proteínas plasmáticas totais, globulinas, glicemia, creatinina e ALT não apresentaram diferenças significativas entre os grupos e entre os períodos pré e pós-tratamento em cada grupo. No entanto, avaliando-se individualmente a glicemia em cada grupo, observou-se que no grupo A sete animais (58%) apresentaram redução da glicemia após o tratamento, já no grupo B somente três animais (25%) e no grupo C, metade dos cães (50%). As médias da glicemia no momento pré do grupo A foi de 91,4 mg/dL e no momento pós 93 mg/dL, no grupo B a média pré tratamento foi 92,5 mg/dL e no momento pós-tratamento 95,5 mg/dL, já no grupo C foi de 91,7 mg/dL no pré e 92,1 mg/dL no momento pós-tratamento.

Tabela 2. Comparação da contagem de eritrócitos, níveis de SDMA, albumina e IL-6 entre os momentos pré e pós-operatório em cada grupo, bem como entre os grupos A, B e C.

PARÂMETRO	GRUPO			p-valor	Valor de referência
	Grupo A DP 1	Grupo B DP 2 e DP 3	Grupo C DP 4		
Eritrócitos (milhões/mm³)					
Pré-operatório	7,80±0,63	8,09±0,64	7,63±0,69 ^a	0,2394	5,7 a 7,4 milhões/mm³
Pós-operatório	7,86±0,66	7,87±1,27	8,08±0,7 ^b	0,8068	
p-valor	0,350	0,272	< 0,05		
SDMA (µg/dL)					
Pré-operatório	12,25±2,42	10,00±1,81	12,25±4,49	0,1420	0 a 16 µg/dL
Pós-operatório	11,33±1,83 ^{xy}	9,17±1,47 ^x	11,83±2,98 ^y	< 0,05	
p-valor	0,076	0,109	0,315		
Albumina (g/dL)					
Pré-operatório	3,12±0,32	3,29±0,31	2,95±0,37 ^a	0,0587	2,5 a 4,0 g/dL
Pós-operatório	3,19±0,24	3,25±0,28	3,06±0,30 ^b	0,2302	
p-valor	0,137	0,159	< 0,05		
IL-6 (pg/mL)					
Pré-operatório	44,35 (8-19202) ^a	54,59 (9,23-3263)	34,88 (6,25-390,22)	0,528	-
Pós-operatório	13,60 (7,4-9230) ^b	48,83 (8-2804)	29,47 (5,16-747,87)	0,331	
p-valor	< 0,01	0,255	0,894		

DP 1=Doença periodontal grau 1; DP 2=Doença periodontal grau 2; DP 3=Doença periodontal grau 3; DP 4=Doença periodontal grau 4; SDMA=Dimetilarginina simétrica; IL-6=Interleucina 6; Resultados de eritrócitos, SDMA e albumina em média ±desvio padrão; Resultados de IL-6 em média (mínimo-máximo); n=12.

^{xy} Valores em linha com diferentes letras sobrescritas diferem entre si (p<0.05)

^{ab} Valores em coluna com diferentes letras sobrescritas diferem entre si (p<0.05)

As análises de correlação entre as variáveis eritrócitos, hematócrito, leucócitos, globulinas, glicemia, albumina, ALT, creatinina, SDMA, IL6, idade e peso, sem distinção de grupos, mostraram correlação negativa entre eritrócitos e SDMA, leucócitos e albumina e SDMA e albumina (Tabela 3). Quando a análise

foi feita em cada grupo, somente houve correlação no grupo A, sendo negativa entre eritrócitos e SDMA, leucócitos e albumina e SDMA e albumina, e correlação positiva entre eritrócitos e albumina (Tabela 4). Não foi observada correlação entre gengivite e as demais variáveis.

Tabela 3. Correlação entre a contagem de eritrócitos, leucócitos, níveis de SDMA e albumina em todos os animais com DP avaliados sem distinção de grupos A, B e C.

Parâmetro	Eritrócitos	Leucócitos	SDMA	Albumina
Eritrócitos		-	-	-
p-valor		0.4764	0.0496*	0.9244
Leucócitos	-		+	-
p-valor	0.4764		0.2604	0.0006*
SDMA	-	-		-
p-valor	0.0496*	0.2604		0.0195*
Albumina	-	-	-	
p-valor	0.9244	0.0006*	0.0195*	

+=Correlação positiva; -=Correlação negativa; *significância estatística com $p < 0,05$; $n=12$.

Tabela 4. Correlação entre a contagem de eritrócitos, leucócitos, níveis de SDMA e albumina nos animais com DP do grupo A.

Grupo A				
Parâmetro	Eritrócitos	Leucócitos	SDMA	Albumina
Eritrócitos		+	-	+
p-valor		0.8675	0.0371*	0.029*
Leucócitos	+		-	-
p-valor	0.8675		0.1513	0.0106*
SDMA	-	-		-
p-valor	0.0371*	0.1513		0.8847
Albumina	+	-	-	
p-valor	0.029*	0.0106*	0.8847	

+=Correlação positiva; -=Correlação negativa; *significância estatística com $p < 0,05$; $n=12$.

Discussão

Os estudos relacionando DP e alterações sistêmicas em seres humanos são expressivos e evoluíram substancialmente nos últimos 30 anos, no entanto em cães os estudos pioneiros foram em cadáveres e são mais recentes (DeBowes et al., 1996; Pavlica et al., 2008), todavia tiveram papel fundamental, diante dos resultados encontrados, em alertar para a necessidade de pesquisas adicionais sobre o impacto da DP na saúde desses animais e quais sistemas e/ou órgãos podem ser potencialmente atingidos.

No presente estudo, a população estudada foi bem heterogênea em relação a idade e ao peso, sem inclusão de animais com sobrepeso ou obesos. O conhecimento atual baseado principalmente em estudos com seres humanos e roedores, aponta que indivíduos obesos têm níveis mais altos de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo IL-6 e TNF, de proteínas de fase aguda, como PCR, e uma expressão aumentada de adipocinas, por exemplo leptina elevada e adiponectina diminuída (Shoelson et al. 2006). Estudos com cães obesos que seguiram programa de perda de peso sugerem que a obesidade canina também está correlacionada com a inflamação de baixo grau e que é reduzida após a perda de peso (German et al., 2009). Eirmann et al. (2009) comparando cães magros e obesos, observaram que os acima do peso apresentaram níveis mais altos de PCR. Diante desse contexto, a obesidade poderia interferir nos parâmetros avaliados, levando a interpretações inadequadas quanto ao papel da DP na inflamação sistêmica, por isso animais com escore corporal acima de 6/9 não foram incluídos no presente estudo. Não há informações quanto ao escore

corporal dos animais nos demais estudos sobre o tema (Glickman et al., 2009; Peddle et al., 2009; Glickman et al., 2011; Rawlinson et al., 2011; Cardoso, 2012; Simões, 2016).

Na figura 1 é possível perceber que quanto maior o grau da DP, menor era o porte do animal e mais avançada era a idade. Já foi demonstrado que a incidência e a gravidade da DP aumentam com a idade, pois é uma doença de caráter crônico e progressivo (Harvey, 2005). Cães de portes pequenos se mostraram particularmente mais suscetíveis em comparação com raças de grande porte. Há relatos que cães de pequeno porte apresentam mais cálculo, inflamação gengival, exposição de furca e perda de inserção gengival e um início mais precoce da doença do que cães maiores, principalmente pelo pequeno tamanho da boca, pela proximidade maior entre os dentes e, que algumas vezes, ainda são mal posicionados (Harvey et al., 1994; Kyllar e Witter, 2005; Kortegaard et al., 2008; Pavlica et al., 2008; O'Neill et al., 2014; Glickman et al., 2009; Wallis et al., 2019). Acredita-se ainda, que o hábito de vida desses animais faz com que fiquem a maior parte do tempo em espaço intradomiciliar, com ambiente restrito, o que pode gerar mais ansiedade, necessidade de se alimentar com mais frequência, além de facilitar o acesso a petiscos caseiros. As cavidades orais pequenas também dificultam a escovação. Adicionalmente, acredita-se que predisposição genética possa ser um dos fatores que explicam a alta suscetibilidade à doença periodontal nesses animais de pequeno porte. No entanto, o conhecimento da genética das doenças periodontais ainda é muito limitado devido à sua natureza poligênica e às interações ambientais e comportamentais (Wallis et al., 2019). Diante desse contexto, é de suma importância que cães de pequeno porte passem por

avaliação periódica odontológica, tenham hábitos de higiene oral diário e façam profilaxia profissional frente a sinais precoces de deposição de placa bacteriana, cálculo e presença de gengivite.

Pode-se dividir as análises feitas nesse estudo em quatro grupos, com base nos objetivos em identificar alterações sistêmicas da DP em determinados órgãos e/ou sistemas. Essas variáveis foram escolhidas com baseadas em estudos prévios já realizados em que pesquisadores detectaram associação entre DP e alterações em determinados órgãos ou alterações em valores hematológicos e bioquímicos (DeBowes et al., 1996; Pavlica et al., 2008; Rawlinson et al., 2011; Cardoso, 2012; Kouki et al., 2013), aliado à disponibilidade de análise no momento de realização da pesquisa. Para avaliar presença de inflamação sistêmica, optou-se pela mensuração de IL-6, albumina, contagem de eritrócitos e leucócitos; e da taxa de filtração glomerular pela análise da creatinina e SDMA; degeneração e necrose hepatocelular pela mensuração de ALT e presença de hiperglicemia pela aferição da glicemia. Todos os cães foram considerados seus próprios animais de controle, uma vez que os estados periodontais saudáveis foram alcançados 30 dias após o tratamento periodontal.

A gengivite crônica ocorre em duas a três semanas após o início do acúmulo de placa. Essa inflamação crônica é acompanhada de acúmulo de linfócitos e plasmócitos, proliferação de capilares e destruição de colágeno (Fiorellini et al., 2012). Todos os animais do estudo apresentaram inflamação gengival, independente do grupo, sendo a maioria de grau 2, sinalizando doença ativa e a cronicidade do quadro infectoinflamatório. Mesmo no grau I da DP caracterizada somente pela presença de gengivite e sem formação de bolsas

periodontais profundas e/ou perda óssea associadas, os eventos imunoinflamatórios do hospedeiro já estão presentes. Isso foi demonstrado, pois os animais apresentaram IL-6 mais elevada antes do tratamento periodontal, assim como no estudo de Cardoso (2012). A IL-6 é o principal regulador da síntese proteica em fase aguda e um dos marcadores inflamatórios mais estudados na doença periodontal, já comprovada a sua elevação em humanos nos diferentes graus da doença (Radafshar et al., 2010; Keles et al., 2014). Infelizmente, a fase inicial da doença em cães ainda é comumente negligenciada, o que contribui para a progressão da doença para os estágios mais avançados. No estudo de Kouki et al. (2013) foi interessante observar a relação significativa entre PCR e os escores elevados de gengivite, em detrimento dos escores de perda óssea, sugerindo que a intensidade da inflamação gengival é proporcional à intensidade da resposta inflamatória sistêmica desencadeada pelo hospedeiro e não apresenta relação direta com a severidade da doença.

Houve redução da IL-6 na maioria dos animais do grupo B e em menor expressividade do grupo C, mesmo sem diferença significativa. Sabe-se que a condição oral é multifatorial e complexa e seu desenvolvimento depende do padrão de resposta do indivíduo. A afecção apresenta fases de quiescência e atividade, e identificar clinicamente o momento em que a doença se encontra é um dos grandes desafios nas pesquisas em seres humanos e em animais. A regulação do sistema imune e do padrão de resposta inflamatória pode ser a justificativa para esses achados. Postula-se que a interação dinâmica entre célula *T-helper* 1 e *T-helper* 2 representa uma possível explicação para aspectos das flutuações na atividade da doença e da progressão clínica observada na DP,

além da identificação de outras subpopulações de células T com função regulatória, que suprimem respostas imunes (Preshaw e Taylor, 2012).

Um efeito final à distância das citocinas produzidas pelos macrófagos é induzir a leucocitose. Vários estudos em humanos demonstraram leucocitose discreta na periodontite em comparação com indivíduos saudáveis e que com o aumento da gravidade e extensão da periodontite, o número periférico de glóbulos brancos aumenta (Loos et al., 2000; Kowolik et al., 2001; Radafshar et al., 2010). A ausência de leucocitose no presente estudo pode ser devido à adaptação da medula óssea nas inflamações crônicas (Latimer e Tvedten, 2004). É possível que essas células sejam recrutadas em níveis mais elevados durante episódios inflamatórios exacerbados de periodontite, diante da bacteremia ou presença de LPS na circulação sistêmica (Tizard, 2017). Sabe-se que ocorre bacteremia constante durante mastigação e escovação dentária em pacientes com doença periodontal crônica, gerando endotoxemia subclínica, desencadeando estímulo contínuo ao sistema imune inato e humoral do hospedeiro, o que desempenha papel no desenvolvimento de doenças sistêmicas, mas sem necessariamente aumento dos leucócitos (Kinane e Lappin, 2001).

A albumina é uma proteína de fase aguda negativa de fácil mensuração na inflamação. Em nosso estudo os valores de albumina maiores após o tratamento periodontal no grupo C, pode estar relacionada à inflamação causada ou não pela bacteremia. Essa bacteremia é normalmente transitória e a cronicidade e a natureza da doença periodontal podem permitir que o fígado se adapte à produção de albumina (Tizard, 2017), de modo que a variação na concentração seja mínima a zero, razões pelas quais pode não ter ocorrido diferença entre os

momentos pré e pós tratamento nos demais grupos. No estudo de Kouki et al. (2013) a albumina não foi estatisticamente relacionada a nenhum outro parâmetro na DP de cães. No presente estudo houve, forte correlação negativa entre o número de leucócitos e a concentração de albumina, sugerindo sua redução, diante da presença da inflamação, além da possível proteinúria, causada por lesão renal por deposição glomerular de imunocomplexos e inflamação do órgão. Esse marcador pode ser usado como adicional nas avaliações clínicas dos pacientes.

Processos inflamatórios crônicos podem causar anemia, por indisponibilizar ferro para os precursores eritroides mediado por proteínas de fase aguda liberadas pelo fígado e também pela lactoferrina (Nelson e Couto, 2006). Sugere-se que a hipoferremia forma um mecanismo protetor do sistema imunológico, uma vez que o ferro contribui para o crescimento de alguns microrganismos (Waner e Harrus, 2000). No presente estudo, foi observado aumento significativo na contagem de eritrócitos no pós-operatório do grupo C, mesmo que ainda dentro dos valores de referência, esse resultado sinaliza para o papel da inflamação sobre a eritropoiese.

Exame histopatológico de fígado de cães com DP identificaram regiões multifocais leves a moderadas de inflamação (DeBowes et al., 1996; Pavlica et al., 2008). No presente, foi possível utilizar a ALT como marcador de degeneração e necrose hepatocelular. Além disso, as concentrações de albumina podem ser usadas na detecção de doença hepática, pois a doença inflamatória crônica pode causar hipoalbuminemia (Webster, 2005). Não foi detectado aumento das concentrações de ALT antes do tratamento e nem redução quando os animais já estavam com o periodonto saudável. Esses

resultados são similares aos encontrados por Rawlinson et al. (2009), que avaliaram, além da ALT, também AST, GGT e bilirrubina total, sem achados significativos. Aumentos na atividade da ALT são observados com necrose hepatocelular e inflamação, é provável que o insulto nos pacientes avaliados seja discreto e de significado clínico mínimo, porém sugere-se investigação mais detalhada do impacto da DP sobre o fígado.

A relação entre DP e diabetes mellitus foi claramente estabelecida em humanos; os estudos confirmam relação bidirecional das duas doenças, ou seja, o DM favorece o desenvolvimento e a gravidade da DP, e o componente inflamatório gerado pela DP pode afetar negativamente o controle metabólico do DM, devido à resistência insulínica causada pela inflamação (Thorstensson, 1996; Morita et al., 2010; Borgnakke et al., 2013; D'Aiuto et al., 2018). Foram encontrados somente dois relatos de cães diabéticos com infecção oral e que se beneficiaram, em relação ao controle glicêmico, do tratamento odontológico (Van Nice, 2006; Pöppel et al., 2014). Portanto, suspeita-se que em cães essa relação também exista, no entanto, nenhuma pesquisa até o momento confirmou essa hipótese. No presente estudo, apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas dos valores glicêmicos entre os grupos de gravidade de doença e nem entre os momentos avaliados, nos grupos A e C observou-se redução da glicemia em, pelo menos, metade dos animais. Dessa forma, recomenda-se futuros estudos sobre o impacto da inflamação sobre os mecanismos de resistência insulínica, e que envolvam DP e cães diabéticos, com o objetivo de identificar nessa população o quanto a infecção oral prejudica o controle glicêmico.

O risco aumentado de DRC em seres humanos portadores de DP já está

estabelecido e que a existência de uma das afecções favorece o surgimento ou a piora da outra (Fisher e Taylor, 2009; Borgnakke 2015; Fernandes, 2017; Pimentel, 2018). Em cães um único estudo, de caráter longitudinal retrospectivo demonstrou que pacientes com DP apresentavam maior incidência de DRC do que aqueles que não apresentavam a afecção e, que quanto mais avançado o estágio de doença periodontal, maiores as concentrações séricas de creatinina, um marcador indireto da taxa de filtração glomerular. Nessas espécies sugere-se insulto renal devido ao aumento da produção de mediadores inflamatórios proporcionada pela periodontite, que estimula o sistema imunológico e também eleva a produção da proteína C-reativa, ocasionando a glomerulonefrite. Além desse mecanismo, as lesões renais podem ser causadas diretamente pela bacteremia e as endotoxinas produzidas pelas bactérias, causando pielonefrite e nefrite intersticial (Fernandes, 2017; DeBowes et al., 1996), e pelo dano glomerular por complexo imune (DeBowes et al., 1996).

No presente estudo, os cães do grupo C, no momento pós-tratamento periodontal apresentaram concentrações de SDMA significativamente elevadas se comparado ao mesmo momento no grupo B. No entanto, quando avaliado individualmente cada animal dentro dos grupos, notou-se que poucos animais se beneficiaram do tratamento periodontal no grupo C, mantendo seus valores de SDMA aumentados. A partir dessa análise sugere-se que nos estágios A e B, após recuperação da saúde oral, há redução da inflamação e melhora da taxa de filtração glomerular, porém no grupo C, mesmo após o tratamento, os valores foram mais elevados, porque a lesão renal pode já ser definitiva, diante da condição infectoinflamatória mais intensa e crônica da doença. Em casos extremos, quando um processo da doença lesiona suficientemente os

glomérulos e/ou interstício, pode resultar em DRC (Polzin, 2011). Não há conhecimento até o momento da existência de estudos em cães avaliando o impacto da DP sobre os valores de SDMA.

Esse fato, aliado a redução de IL-6 no grupo A após tratamento, sugere inflamação e alerta para a importância de se realizar o tratamento precoce, impedindo a evolução da doença para os estágios mais avançados e a instalação de lesões irreversíveis em órgãos e sistemas. Esse raciocínio é, ainda, confirmado pelo fato de ter sido identificada correlação negativa entre SDMA e eritrócitos e albumina. Frente à redução das hemácias circulantes, há redução da taxa de filtração glomerular, conseqüentemente aumento do SDMA. A albumina como marcador inflamatório negativo, diminui conforme o SDMA aumenta, sugerindo a condição inflamatória do paciente. Outra possibilidade pode ser a lesão glomerular já instalada, causar proteinúria. A pesquisa de albumina na urina desses pacientes, poderiam confirmar essa hipótese.

Não houve diferenças significativas sobre os valores de creatinina, uma vez que esse marcador indireto de taxa de filtração glomerular aumenta somente quando a lesão renal já está avançada, enaltecendo a importância de um marcador precoce de lesão renal e necessidade do tratamento periodontal precoce. O estudo realizado por Rawlinson et al. (2009) avaliou alguns marcadores de alteração renal em cães (creatinina, relação proteína creatinina urinária, densidade urinária, fósforo) não conseguindo concluir relação direta com a DP ou a gravidade da mesma.

Estudos de intervenção na década de 2000 mostraram que a terapia periodontal pode modular fatores de risco para doença cardiovascular em

humanos. Além disso, um ensaio randomizado de 2007 sustentou que a instrumentação periodontal é um estressor sistêmico de curto prazo, mas também documentou redução substancial na inflamação sistêmica após tratamento periodontal (Tonetti et al., 2007). Esses autores também mostraram que a terapia antimicrobiana local adjunta melhorou a inflamação sistêmica, demonstrando que o tratamento periodontal pode melhorar a função endotelial e reduzir os marcadores inflamatórios relacionados ao risco cardiovascular. Foi perceptível no presente estudo que o tratamento periodontal, especialmente quando da remoção da placa bacteriana e cálculo, reduz nas horas subsequentes, a hiperemia e o edema gengival, pois a remoção das bactérias periodontopatogênicas cessa o processo de agressão tecidual, interrompendo a progressão da DP e, possivelmente o impacto sobre a saúde sistêmica, especialmente no estágio inicial da doença, com a redução da IL-6 pós tratamento. Infelizmente, no estágio mais grave da doença, lesões renais podem ser irreversíveis. Os estudos com cães que foram submetidos ao tratamento periodontal comprovaram esses benefícios (Rawlinson et al., 2009; Cardoso, 2012). O período de 30 dias de reavaliação foi escolhido para permitir que os valores retornassem dentro dos respectivos intervalos de referência e para garantir a cura oral adequada após o tratamento e a adequada interpretação dos marcadores de saúde sistêmica na ausência de doença oral.

Diferenças individuais na regulação da resposta inflamatória podem contribuir para a suscetibilidade periodontal. Na odontologia humana, é bem reconhecido que existem alguns “fenótipos hiperinflamatórios” cujas vias imunorreguladoras são bastante alteradas (Gaudilliere et al., 2019). Essa

característica genética, além do comportamento variável na DP, em relação as fases de atividade e quiescência, podem ser extrapoladas para cães, justificando os resultados em cada um dos momentos distintos e entre os grupos, diferentes dos esperados sob, especialmente, os marcadores inflamatórios avaliados.

Conclusões

A análise dos resultados deste estudo revelou que cães com DP discreta apresentam valores elevados de IL-6 se comparado ao momento pós tratamento periodontal. Após tratamento da DP, observou-se que quanto maior a severidade da doença menor a recuperação da taxa de filtração glomerular.

Embora nenhuma relação causal possa ser comprovada pelo presente estudo, a associação da DP à carga inflamatória sistêmica geral e à saúde de órgãos destaca a necessidade de pesquisa continuada e a importância do tratamento precoce da infecção oral para evitar danos irreversíveis locais e sistêmicos.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradecemos à CLINILAB Laboratório de Patologia Clínica Veterinária pelo apoio na separação e armazenamento das amostras.

Agradecemos à IDEXX Laboratories Brasil® pelo financiamento das análises do SDMA.

Referências

- American Veterinary Dental College (AVDC), 2005. Stages of Periodontal Disease. URL <https://www.avdc.org/Nomenclature/Nomenclature.html#periostages> (accessed 03.20.18).
- Beck, J.D., Papapanou, P.N., Philips, K.H., Offenbacher, S., 2019. Periodontal Medicine: 100 Years of Progress. *J. Dent. Res.* 98, 1053–1062. <https://doi.org/10.1177/0022034519846113>
- Bellows, J., Berg, M.L., Dennis, S., Harvey, R., Lobprise, H.B., Snyder, C.J., Stone, A.E.S., Van de Wetering, A.G., 2019. 2019 AAHA Dental Care Guidelines for Dogs and Cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 55, 49–69. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-6933>
- Borgnakke, W., Ylöstalo, P., Taylor, G., 2013. Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence. *J. Clin. Periodontol.* 40, S135–52. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.1340013>
- Borgnakke, W.S., 2015. Does Treatment of Periodontal Disease Influence Systemic Disease? *Dent. Clin. North Am.* 59, 885–917. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2015.06.007>
- Cardoso, J., 2012. Mensuração sérica de interleucina-1 β , Interleucina-6, Interleucina-10 e Fator de necrose Tumoral α em cães com doença periodontal crônica. Universidade de São Paulo.
- Cleland, W.P., 2000. Nonsurgical periodontal therapy. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 15, 221–225. <https://doi.org/10.1053/svms.2000.21043>
- DeBowes, L.J., Mosier, D., Logan, E., Harvey, C.E., Lowry, S., Richardson, D.C., 1996. Association of periodontal disease and histologic lesions in multiple organs from 45 dogs. *J. Vet. Dent.* 13, 57–60. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9520780>
- DiBartola, S., 2000. Clinical approach and laboratory evaluation of renal disease, in: Ettinger, S., Feldman, E. (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Saunders, Philadelphia, pp. 1600–1614.
- Eirmann, L.A., Freeman, L.M., Laflamme, D.P., Michel, K.E., Satyaraj, E., 2009.

- Comparison of adipokine concentrations and markers of inflammation in obese versus lean dogs. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.* 7, 196–205. <https://www.jarvm.com/articles/Vol7Iss4/Eirmann.pdf>
- Fernandes MA, 2017. A Associação entre periodontite e a doença renal crônica. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz.
- Fernandes, N.A., Borges, A.P.B., Reis, E.C.C., Sepúlveda, R.V., Pontes, K.C. de S., 2012. Prevalence of periodontal disease in dogs and owners' level of awareness - a prospective clinical trial. *Rev. Ceres* 59, 446–451. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2012000400003>
- Fiorellini, J., Kim, D., Ishikawa, S., 2012. Gingival Inflammation, in: Carranza, F., Newman, M., Takei, H., Klokkevold, P. (Eds.), *Carranza's Clinical Periodontology*. Elsevier Saunders, Saint Louis.
- Fisher, M.A., Taylor, G.W., 2009. A Prediction Model for Chronic Kidney Disease Includes Periodontal Disease. *J. Periodontol.* 80, 16–23. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.080226>
- Gaudilliere, D.K., Culos, A., Djebali, K., Tsai, A.S., Ganio, E.A., Choi, W.M., Han, X., Maghaireh, A., Choisy, B., Baca, Q., Einhaus, J.F., Hedou, J.J., Bertrand, B., Ando, K., Fallahzadeh, R., Ghaemi, M.S., Okada, R., Stanley, N., Tanada, A., Tingle, M., Alpagot, T., Helms, J.A., Angst, M.S., Aghaeepour, N., Gaudilliere, B., 2019. Systemic Immunologic Consequences of Chronic Periodontitis. *J. Dent. Res.* 98, 985–993. <https://doi.org/10.1177/0022034519857714>
- German, A.J., Hervera, M., Hunter, L., Holden, S.L., Morris, P.J., Biourge, V., Trayhurn, P., 2009. Improvement in insulin resistance and reduction in plasma inflammatory adipokines after weight loss in obese dogs. *Domest. Anim. Endocrinol.* 37, 214–226. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2009.07.001>
- Glickman, L., Glickman, N., Moore, G., Goldstein, G., Lewis, H., 2009. Evaluation of the risk of endocarditis and other cardiovascular events on the basis of the severity of periodontal disease in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 234, 486–484. <https://doi.org/10.2460/javma.234.4.486>

- Gurgel, B., Pinto, F., Sallum, E., Notici, F., Casati, M., Toledo, S., 2004. Perspectives on the use of nonsteroidal antiinflammatories on periodontal therapy. *J. Periodontol.* 12, 12–16.
- Harvey, C., 2005. Management of periodontal disease: understanding the options. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 31, 819–836. <https://doi.org/>
- Harvey, C., Emily, P., 1993. *Small animal dentistry*, 1 ed. ed. Editora Mosby, Saint Louis. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2005.03.002>
- Keles, Z.P., Keles, G.C., Avci, B., Cetinkaya, B.O., Emingil, G., 2014. Analysis of YKL-40 Acute-Phase Protein and Interleukin-6 Levels in Periodontal Disease. *J. Periodontol.* 85, 1240–1246. <https://doi.org/10.1902/jop.2014.130631>
- Kinane, D.F., Lappin, D.F., 2001. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol. Scand.* 59, 154–60. <https://doi.org/10.1080/000163501750266747>
- Kouki, M., Papadimitriou, S., Kazakos, G., Savas, I., Bitchava, D., 2013. Periodontal Disease as a Potential Factor for Systemic Inflammatory Response in the Dog. *J. Vet. Dent.* 30, 26–29. <https://doi.org/10.1177/089875641303000103>
- Kowolik, M.J., Dowsett, S.A., Rodriguez, J., De La Rosa R, M., Eckert, G.J., 2001. Systemic Neutrophil Response Resulting From Dental Plaque Accumulation. *J. Periodontol.* 72, 146–151. <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.2.146>
- Kyllar, M., Witter, K., 2012. Prevalence of dental disorders in pet dogs. *Vet. Med. (Praha)*. 50, 496–505. <https://doi.org/10.17221/5654-VETMED>
- Latimer, K.S., Tvedten, H., 2004. Leucocytes disorders, in: Willard, Tvedten (Eds.), *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. Saunders, Saint Louis, pp. 52–74.
- Loos, B.G., Craandijk, J., Hoek, F.J., Dillen, P.M.E.W., Velden, U. Van Der, 2000. Elevation of Systemic Markers Related to Cardiovascular Diseases in the Peripheral Blood of Periodontitis Patients. *J. Periodontol.* 71, 1528–1534. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.10.1528>
- Lund, E.M., Armstrong, P.J., Kirk, C.A., Kolar, L.M., Klausner, J.S., 1999. Health

- status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214, 1336–41. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10319174>
- Monsarrat, P., Blaizot, A., Kémoun, P., Ravaud, P., Nabet, C., Sixou, M., Vergnes, J.-N., 2016. Clinical research activity in periodontal medicine: a systematic mapping of trial registers. *J. Clin. Periodontol.* 43, 390–400. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12534>
- Morinha, F., Albuquerque, C., Requicha, J., Dias, I., Gut, I., Guedes-Pinto, H., Viegas, C., Bastos, E., 2011. Detection and characterization of interleukin-6 gene variants in *Canis familiares*: Association studies with pweriodontal disease. *Gen* 485, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.06.018>
- Morita, T., Yamazaki, Y., Mita, A., Takada, K., Seto, M., Nishinoue, N., Sasaki, Y., Motohashi, M., Maeno, M., 2010. A Cohort Study on the Association Between Periodontal Disease and the Development of Metabolic Syndrome. *J. Periodontol.* 81, 512–519. <https://doi.org/10.1902/jop.2010.090594>
- Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.* 168, 28–40. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(03\)00119-9](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00119-9)
- Nabity, M.B., Lees, G.E., Boggess, M.M., Yerramilli, M., Obare, E., Yerramilli, M., Rakitin, A., Aguiar, J., Relford, R., 2015. Symmetric Dimethylarginine Assay Validation, Stability, and Evaluation as a Marker for the Early Detection of Chronic Kidney Disease in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 29, 1036–1044. <https://doi.org/10.1111/jvim.12835>
- Niemiec, B.A., 2008. Periodontal Disease. *Top. Companion Anim. Med.* 23, 72–80. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2008.02.003>
- O'Neill, D.G., Butcher, C., Church, D.B., Brodbelt, D.C., Gough, A.G., 2019. Miniature Schnauzers under primary veterinary care in the UK in 2013: demography, mortality and disorders. *Canine Genet. Epidemiol.* 6, 1. <https://doi.org/10.1186/s40575-019-0069-0>
- O'Neill, D.G., Church, D.B., McGreevy, P.D., Thomson, P.C., Brodbelt, D.C., 2014. Prevalence of Disorders Recorded in Dogs Attending Primary-Care

- Veterinary Practices in England. PLoS One 9, e90501. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090501>
- Pavlica, Z., Petelin, M., Juntos, P., Eržen, D., Crossley, D.A., Skalerič, U., 2008. Periodontal Disease Burden and Pathological Changes in Organs of Dogs. J. Vet. Dent. 25, 97–105. <https://doi.org/10.1177/089875640802500210>
- Peddle, G.D., Drobatz, K.J., Harvey, C.E., Adams, A., Sleeper, M.M., 2009. Association of periodontal disease, oral procedures, and other clinical findings with bacterial endocarditis in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 234, 100–107. <https://doi.org/10.2460/javma.234.1.100>
- Pelander, L., Häggström, J., Larsson, A., Syme, H., Elliott, J., Heiene, R., Ljungvall, I., 2019. Comparison of the diagnostic value of symmetric dimethylarginine, cystatin C, and creatinine for detection of decreased glomerular filtration rate in dogs. J. Vet. Intern. Med. 33, 630–639. <https://doi.org/10.1111/jvim.15445>
- Pimentel, L., 2018. Alterações Periodontais em pacientes com insuficiência renal crônica. Instituto Universitário Egas Moniz.
- Polzin, D.J., 2011. Chronic Kidney Disease in Small Animals. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 41, 15–30. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.09.004>
- Pöppel, A.G., 2014. Diabetes Mellitus e Periodontite: O Elo Esquecido na Medicina Veterinária. Assoc. Bras. Endocrinol. Veterinária. URL <http://www.abev.org.br/artigo.php?ntcid=266> (accessed 12.15.15).
- Preshaw, P.M., Taylor, J.J., 2012. Patogênese Periodontal, in: Carranza, F., Newman, M., Takei, H., Klokkevold, P. (Eds.), Carranza's Clinical Periodontology. Elsevier Saunders, Saint Louis.
- Radafshar, G., Shad, B., Ariamajd, E., Geranmayeh, S., 2010. Effect of intensive non-surgical treatment on the level of serum inflammatory markers in advanced periodontitis. J. Dent. (Tehran). 7, 24–30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3184718/>
- Rawlinson, J.E., Goldstein, R.E., Reiter, A.M., Attwater, D.Z., Harvey, C.E., 2011. Association of periodontal disease with systemic health indices in dogs and the systemic response to treatment of periodontal disease. J. Am. Vet. Med.

- Assoc. 238, 601–609. <https://doi.org/10.2460/javma.238.5.601>
- Shin, Y.J., Choung, H.W., Lee, J.H., Rhyu, I.C., Kim, H.D., 2019. Association of Periodontitis with Oral Cancer: A Case-Control Study. *J. Dent. Res.* 98, 526–533. <https://doi.org/10.1177/0022034519827565>
- Shoelson, S.E., 2006. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 1793–1801. <https://doi.org/10.1172/JCI29069>
- Simões, G.J.M., Requicha, J., Mestrinho, L., 2016. Avaliação dos níveis séricos de proteína C reativa em cães com doença periodontal. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- Stella, J.L., Bauer, A.E., Croney, C.C., 2018. A cross-sectional study to estimate prevalence of periodontal disease in a population of dogs (*Canis familiaris*) in commercial breeding facilities in Indiana and Illinois. *PLoS One* 13, e0191395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191395>
- Takeuchi, K., Matsumoto, K., Furuta, M., Fukuyama, S., Takeshita, T., Ogata, H., Suma, S., Shibata, Y., Shimazaki, Y., Hata, J., Ninomiya, T., Nakanishi, Y., Inoue, H., Yamashita, Y., 2019. Periodontitis Is Associated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Dent. Res.* 98, 534–540. <https://doi.org/10.1177/0022034519833630>
- Thorstensson, H., Kuylensstiema, J., Hugoson, A., 1996. Medical Status and complications in relation to periodontal disease experience in insulin-dependent diabetics. *J. Clin. Periodontol.* 23, 194–202. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1996.tb02076.x>
- Tizard, I.R., 2009. *Imunologia Veterinária*, 8th ed. Elsevier, Rio de Janeiro.
- Tonetti, M.S., Greenwell, H., Kornman, K.S., 2018. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J. Periodontol.* 89, S159–S172. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0006>
- Van Nice, E., 2006. Management of Multiple Dental Infections in a Dog with Diabetes Mellitus. *J. Vet. Dent.* 23, 18–25. <https://doi.org/10.1177/089875640602300103>
- Wallis, C., Pesci, I., Colyer, A., Milella, L., Southerden, P., Holcombe, L.J.,

- Desforbes, N., 2019. A longitudinal assessment of periodontal disease in Yorkshire terriers. *BMC Vet. Res.* 15, 207. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1923-8>
- Waner, T., Harrus, S., 2000. Anemia of inflammatory disease, in: Feldman, B. V, Zinkl, J.G., Jain, N.C. (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 205–208.
- Webster, C.R., 2005. History, clinical signs, and physical findings in hepatobiliary disease., in: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Disease of the Dog and Cat*. Elsevier Saunders Co, Saint Louis, p. 1424.
- Wolf, H., Rateitschak, K., Hassell, T., 2005. Pathogenesis—reactions and defense capabilities of the host, in: Wolf, H.F., Rateitschak-Pluss, E. (Eds.), *Color Atlas of Dental Medicine: Periodontology*. Thieme.

CAPITULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A doença periodontal tem alta prevalência em cães, afetando em torno de 85% dos animais acima dos quatro anos de idade. Apresenta caráter infeccioso múltiplo, que na sua fase inicial é caracterizada pela gengivite, seguida de lesões periodontais extensas, desencadeando resposta inflamatória local e sistêmica no paciente. Em seres humanos, o estudo das consequências sistêmicas da DP chama-se medicina periodontal e é amplamente pesquisada há aproximadamente 100 anos.

Pesquisas confirmaram o impacto da DP sobre mais de 50 condições sistêmicas, com marcante relação entre a doença oral e condições cardiovasculares, resistência insulínica, transtornos na gravidez e doença renal crônica. Em cães, os dois primeiros estudos sobre o tema sinalizaram que alterações patológicas nos órgãos poderiam estar relacionadas à DP. Na sequência estudos *in vivo* mostraram haver relação da infecção oral com alterações sistêmicas cardíacas, renais e inflamatórias. Ainda assim, é escasso o conhecimento sobre o tema em cães, sendo fundamental investigações sobre o impacto da DP na saúde sistêmica desses animais. Dois desses estudos foram retrospectivos, com questionamento quanto à metodologia empregada.

A análise dos resultados da presente tese revela associações entre a DP e alterações sistêmicas sob aspectos inflamatório e renal, mesmo nos estágios iniciais da doença. O tratamento da DP impactou sobre a IL-6, demonstrando ser efetivo no combate à inflamação. Adicionalmente, pode-se observar que quanto maior a severidade da doença, menor a recuperação da taxa de filtração glomerular, mesmo após tratamento da infecção oral. Essa relação foi percebida por meio de análise de um marcador precoce de lesão glomerular, o SDMA. A creatinina, que é amplamente utilizada não demonstrou mudança de valores nos períodos pré e pós-tratamento, pois sua concentração aumenta quando a lesão renal já está em fase avançada.

Alguns desses achados são compatíveis com os resultados de estudos mais extensos em seres humanos. Embora nenhuma relação causal

possa ser comprovada pelo presente estudo, ele sinaliza associação da DP à alguns distúrbios sistêmicos, destacando a necessidade de pesquisa continuada e a importância do tratamento precoce da infecção oral para evitar danos irreversíveis locais e sistêmicos. Portanto, essa pesquisa aponta para inúmeros caminhos que precisam ser explorados na medicina de cães e gatos, pois ainda há grande desconhecimento sobre o tema, especialmente quando comparado à medicina periodontal em humanos.

Estudos em pacientes com DP e diabetes são fundamentais para entender se a DP em cães causa resistência insulínica, assim como observado em seres humanos. Além disso, pacientes com doença renal, precisam ter controladas todas as possíveis causas de agressão renal adicional, como doenças inflamatórias crônicas, com a finalidade de reduzir a velocidade de progressão da doença e aumentar a expectativa e qualidade de vida deste paciente. Dessa forma estudos em cães com DP e também DRC são fundamentais.

REFERÊNCIAS

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499–511.

American Veterinary Dental College (AVDC). Stages of Periodontal Disease. 2005; Disponível em: <<https://www.avdc.org/Nomenclature/Nomenclature.html#periostages>>. Acesso em 20 mar 2018.

Baia JD. Desenvolvimento e validação de uma cartilha educativa sobre a doença periodontal em cães e gatos. Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; São Paulo; 2018.

Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal Disease and Cardiovascular Disease. *J Periodontol*. 1996; 67(10s):1123–1137.

Beck JD, Papapanou PN, Philips KH, Offenbacher S. Periodontal Medicine: 100 Years of Progress. *J Dent Res*. 2019;98(10):1053–62.

Bellows J. Smile Book IV - Small Animal Dental Anatomy, Pathology and Charting. Nova York: Pfizer Animal Health; 2004.

Bellows J. Introducing intraoral radiography into your patient care protocol. *dvm360*. 2013; Disponível em: <<http://veterinarynews.dvm360.com/introducing-intraoral-radiography-your-patient-care-protocol>>. Acesso em: 21 ago 2019.

Bellows J, Berg ML, Dennis S, et al. 2019 AAHA Dental Care Guidelines for Dogs and Cats. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2019;55(2):49–69.

Borgnakke W, Ylöstalo P, Taylor G, et al. Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence. *J Clin Periodontol*. 2013;40(14):S135–52.

Borgnakke WS. Does Treatment of Periodontal Disease Influence Systemic Disease? *Dent Clin North Am*. 2015;59(4):885–917.

Buttke TM, Shipper G, Delano EO, Trope M. C-Reactive Protein and Serum

Amyloid A in a Canine Model of Chronic Apical Periodontitis. *J Endod.* 2005;31(10):728–32.

Cardoso J. Mensuração sérica de interleucina-1 β , Interleucina-6, Interleucina-10 e Fator de necrose Tumoral α em cães com doença periodontal crônica. Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo; 2012.

Carranza F, Takei H. Bone Loss and Patterns of Bone Destruction. In: Carranza F, Newman M, Takei H, Klokkevold P. Carranza's clinical periodontology. 11 ed. Saint Louis: Elsevier Saunders; 2012.

Cleland WP. Nonsurgical periodontal therapy. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2000;15(4):221–5.

D'Aiuto F, Gkraniias N, Bhowruth D, Khan T, Orlandi M, Suvan J, Masi S, Tsakos G, Hurel S, Hingorani AD, et al. Systemic effects of peri-odontitis treatment in patients with type 2 diabetes: a 12 month, single- centre, investigator-masked, randomised trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2018;6(12):954–965.

Dahlén G, Charalampakis G, Abrahamsson I, Bengtsson L, Falsen E. Predominant bacterial species in subgingival plaque in dogs. *J Periodontal Res.* 2012;47(3):354–64.

Davis IJ, Wallis C, Deusch O, Colyer A, Milella L, Loman N, Harris S. A Cross-Sectional Survey of Bacterial Species in Plaque from Client Owned Dogs with Healthy Gingiva, Gingivitis or Mild Periodontitis. *PLoS ONE.* 2013; 8(12):e83158.

DeBowes LJ, Mosier D, Logan E, Harvey CE, Lowry S, Richardson DC. Association of periodontal disease and histologic lesions in multiple organs from 45 dogs. *J Vet Dent.* 1996;13(2):57–60.

Dewhirst FE, Klein EA, Thompson EC, et al. The Canine Oral Microbiome. *PLoS ONE.* 2012;7(4):e36067.

DiBartola S. Clinical approach and laboratory evaluation of renal disease. In: Ettinger S, Feldman. Textbook of veterinary internal medicine. 5 ed. Philadelphia:

Saunders; 2000. p. 1600–14.

DiBartola S, Westropp J. Doenças do Trato Urinário. In: Nelson R, Couto C. Medicina Interna de Pequenos Animais. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2015.

Dixon DR, Bainbridge BW, Darveau, RP. Modulation of the innate immune response within the periodontium. *Periodontol* 2000; 35(1): 53–74, 2004.

Eirmann LA, Freeman LM, Laflamme DP, Michel KE, Satyaraj E. Comparison of adipokine concentrations and markers of inflammation in obese versus lean dogs. *Int J Appl Res Vet M*. 2009; 7(4):196–205.

Elliott DR, Wilson M, Buckley CMF, Spratt DA. Cultivable Oral Microbiota of Domestic Dogs. *J Clin Microbiol*. 2005;43(11):5470–6.

Fernandes MA. A Associação entre periodontite e a doença renal crônica. Curso de Odontologia, Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. Almada; 2017.

Fernandes NA, Borges APB, Reis ECC, Sepúlveda RV, Pontes KC de S. Prevalence of periodontal disease in dogs and owners' level of awareness - a prospective clinical trial. *Rev Ceres*. 2012;59(4):446–51.

Fiorellini J, Kim D, Ishikawa S. The Gingiva. In: Carranza F, Newman M, Takei H, Klokkevold P. Carranza's clinical periodontology. 11 ed. Saint Louis: Elsevier Saunders; 2012^a.

Fiorellini J, Kim D, Ishikawa S. Gingival Inflammation. In: Carranza F, Newman M, Takei H, Klokkevold P. Carranza's clinical periodontology. 11 ed. Saint Louis: Elsevier Saunders; 2012^b.

Fisher MA, Taylor GW. A Prediction Model for Chronic Kidney Disease Includes Periodontal Disease. *J Periodontol*. 2009; 80(1):16–23.

Gaudilliere DK, Culos A, Djebali K, Tsai AS, Ganio EA, Choi WM, Han X, Maghaireh A, Choisy B, Baca Q, Einhaus JF, Hedou JJ, Bertrand B, Ando K, Fallahzadeh R, Ghaemi MS, Okada R, Stanley N, Tanada A, Tingle M, Alpagot T, Helms JA, Angst MS, Aghaeepour N, Gaudilliere B. Systemic Immunologic

Consequences of Chronic Periodontitis. J Dent Res. 2019; 98(9):985–993.

German AJ, Hervera M, Hunter L, Holden SL, Morris PJ, Biourge V, Trayhurn P. Improvement in insulin resistance and reduction in plasma inflammatory adipokines after weight loss in obese dogs. Domest Anim Endocrinol. 2009; 37(4):214–226.

Gioso M. Odontologia para o clínico de pequenos animais. 6 ed. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1994.

Glickman I. The periodontium, pancreas and blood sugar levels in experimental diabetes. J Dent Res. 1946; 25:169.

Glickman L, Glickman N, Moore G, Lund E, Lantz G, Pressler B. Association between chronic azotemic kidney disease and the severity of periodontal disease in dogs. Prev Vet Med. 2011; 193–200.

Glickman L, Glickman N, Moore G, Goldstein G, Lewis H. Evaluation of the risk of endocarditis and other cardiovascular events on the basis of the severity of periodontal disease in dogs. J Am Vet Med Assoc. 2009;234:486–484.

Greene C. Doenças infecciosas em cães e gatos. 4 ed. Roca; 2015.

Gurgel B, Pinto F, Sallum E, Notici F, Casati M, Toledo S. Perspectives on the use of nonsteroidal antiinflammatories on periodontal therapy. J Periodontol. 2004;12(2):12–6.

Haffajee A, Socransky S. Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. Periodontol. 2000;42:7–12.

Hajishengallis G. Complement and periodontitis. Biochem Pharmacol. 2010;80(12):1992–2001.

Hans M, Hans VM. Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. J Oral Sci. 2011; 53(3):263–71.

Hardham J, Dreier K, Wong J, Sfintescu C, Evans RT. Pigmented-anaerobic bacteria associated with canine periodontitis. Vet Microbiol. 2005;106(1–2):119–

28.

Harvey C. Management of periodontal disease: understanding the options. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2005;31:819–36.

Harvey C, Emily P. *Small animal dentistry.* 1 ed. Saint Louis: Editora Mosby; 1993.

Hinrichs JE, Novak M. Classification of Diseases and Conditions Affecting the Periodontium. In: Carranza F, Newman M, Takei H, Klokkevold P. *Carranza's clinical periodontology.* 11 ed. Saint Louis: Elsevier Saunders; 2012.

Holcombe LJ, Patel N, Colyer A, Deusch O, O'Flynn C, Harris S. Early Canine Plaque Biofilms: Characterization of Key Bacterial Interactions Involved in Initial Colonization of Enamel. *PLoS ONE.* 2014; 9(12):e113744.

Ioannidou E, Swede H, Dongari-Bagtzoglou A.. Periodontitis predicts elevated C-reactive protein levels in chronic kidney disease. *J Dent Res.* 2011; 90(12):1411–1415.

Keles ZP, Keles GC, Avci B, Cetinkaya BO, Emingil G. Analysis of YKL-40 Acute-Phase Protein and Interleukin-6 Levels in Periodontal Disease. *J Periodontol.* 2014; 85(9):1240–1246.

Kinane DF, Lappin DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand.* 2001; 59(3):154–60.

Klokkevold PR, Mealey BL. Influence of systemic conditions on the periodontium. In: Carranza F, Newman M, Takei H, Klokkevold P. *Carranza's clinical periodontology.* 11 ed. Saint Louis: Elsevier Saunders; 2012.

Kouki M, Papadimitriou S, Kazakos G, Savas I, Bitchava D. Periodontal Disease as a Potential Factor for Systemic Inflammatory Response in the Dog. *J Vet Dent.* 2013;30(1):26–9.

Kowolik MJ, Dowsett SA, Rodriguez J, De La Rosa R M, Eckert GJ. Systemic Neutrophil Response Resulting From Dental Plaque Accumulation. *J Periodontol.* 2001; 72(2):146–151.

Kurgan S, Kantarci A. Molecular basis for immunohistochemical and inflammatory changes during progression of gingivitis to periodontitis. *Periodontol* 2000. 2018;76(1):51–67.

Kyllar M, Witter K. Prevalence of dental disorders in pet dogs. *Vet Med*. 2012;50(No. 11):496–505.

Latimer KS, Tvedten H. Leucocytes disorders. Small animal clinical diagnosis by laboratory methods. In: Willard, Tvedten. 4 ed. Saint Louis: Saunders; 2004.

Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Dillen PMEW, Velden U Van Der. Elevation of Systemic Markers Related to Cardiovascular Diseases in the Peripheral Blood of Periodontitis Patients. *J Periodontol*. 2000; 71(10):1528–1534.

Loos BG. Systemic Markers of Inflammation in Periodontitis. *J Periodontol*. 2005;76(11-s):2106–15.

Lund E, Armstrong P, Kirk C, et al. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *J Am Vet Med Assoc*. 1999;214:1336–41.

Mariotti A. Dental Plaque-Induced Gingival Diseases. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):7–17.

Martins MD, Martins MAT. Etiopatogênese da doença periodontal. In: Brunetti MC, Fernandes MI, Moraes, RGB. Fundamentos da periodontia: Teoria e Prática. São Paulo: Artes Médicas; 2007.

Monsarrat P, Blaizot A, Kémoun P, et al. Clinical research activity in periodontal medicine: a systematic mapping of trial registers. 1. *J Clin Periodontol*. 2016;43(5):390–400.

Morinha F, Albuquerque C, Requicha J, Dias I, Gut I, Guedes-Pinto H, Viegas C, Bastos E. Detection and characterization of interleukin-6 gene variants in Canis familiares: Association studies with pperiodontal disease. *Gen*. 2011; 485:139–145.

Morita T, Yamazaki Y, Mita A, Takada K, Seto M, Nishinoue N, Sasaki Y,

Motohashi M, Maeno M. A Cohort Study on the Association Between Periodontal Disease and the Development of Metabolic Syndrome. *J Periodontol*. 2010; 81(4):512–519.

Murata H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J*. 2004; 168(1):28–40.

Nabity MB, Lees GE, Boggess MM, et al. Symmetric Dimethylarginine Assay Validation, Stability, and Evaluation as a Marker for the Early Detection of Chronic Kidney Disease in Dogs. *J Vet Intern Med*. 2015;29(4):1036–44.

Niemiec B. Local and Regional Consequences of Periodontal Disease. In: Niemiec B, editor. *Veterinary Periodontology*. Ames: Wiley Blackwell; 2013. p. 69–80.

Niemiec BA. Periodontal Disease. *Top Companion Anim Med*. 2008;23(2):72–80.

O'Neill DG, Church DB, McGreevy PD, Thomson PC, Brodbelt DC. Prevalence of Disorders Recorded in Dogs Attending Primary-Care Veterinary Practices in England. *PLoS ONE*. 2014; 9(3):e90501.

O'Neill DG, Butcher C, Church DB, Brodbelt DC, Gough AG. Miniature Schnauzers under primary veterinary care in the UK in 2013: demography, mortality and disorders. *Canine Genet Epidemiol*. 2019;6(1):1.

Papadimitriou S, Tsantarliotou M, Makris G, et al. A clinical study of plasminogen activator activity in gingival tissue in dogs with gingivitis and periodontitis. *Res Vet Sci*. 2006;80(2):189–93.

Pavlica Z, Petelin M, Juntos P, Eržen D, Crossley DA, Skalerič U. Periodontal Disease Burden and Pathological Changes in Organs of Dogs. *J Vet Dent*. 2008;25(2):97–105.

Peddle GD, Drobatz KJ, Harvey CE, Adams A, Sleeper MM. Association of periodontal disease, oral procedures, and other clinical findings with bacterial endocarditis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2009; 234(1):100–107.

Pelander L, Häggström J, Larsson A, et al. Comparison of the diagnostic value of symmetric dimethylarginine, cystatin C, and creatinine for detection of decreased glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Intern Med.* 2019;33(2):630–9.

Pimentel L. Alterações Periodontais em pacientes com insuficiência renal crônica. Mestrado Integrado em Medicina Dentária, Instituto Universitário Egas Moniz. Almada; 2018.

Polzin DJ. Chronic Kidney Disease in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 2011; 41(1):15–30.

Pöppel AG. Diabetes Mellitus e Periodontite: O Elo Esquecido na Medicina Veterinária. Associação Brasileira de Endocrinologia Veterinária. 2014; Disponível em: <<http://www.abev.org.br/artigo.php?ntcid=266>>. Disponível em: 15 dez 2015.

Preshaw PM, Taylor JJ. Patogênese Periodontal. Carranza's clinical periodontology. In: Carranza, F, Newman, M, Takei, H, Klokkevold, P. 11 ed. Elsevier Saunders, Saint Louis; 2012.

Radafshar G, Shad B, Ariamajd E, Geranmayeh S. Effect of intensive non-surgical treatment on the level of serum inflammatory markers in advanced periodontitis. *J Dent (Tehran, Iran).* 2010; 7(1):24–30.

Rawlinson JE, Goldstein RE, Reiter AM, Attwater DZ, Harvey CE. Association of periodontal disease with systemic health indices in dogs and the systemic response to treatment of periodontal disease. *J Am Vet Med Assoc.* 2011;238(5):601–9.

Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective Study of C-Reactive Protein and the Risk of Future Cardiovascular Events Among Apparently Healthy Women. *Circ J.* 1998; 98(8):731–733.

Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *N Engl J Med.* 1999; 340(2):115–126.

Seymour GJ, Taylor JJ. Shouts and whispers: an introduction to immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2004; 35: 9-13

Shin YJ, Choung HW, Lee JH, Rhyu IC, Kim HD. Association of Periodontitis with Oral Cancer: A Case-Control Study. *J Dent Res*. 2019; 98(5):526–533.

Shoelson SE. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006; 116(7):1793–1801.

Simões GJM, Requicha J, Mestrinho L. Avaliação dos níveis séricos de proteína C reativa em cães com doença periodontal. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa; 2016.

Stella JL, Bauer AE, Croney CC. A cross-sectional study to estimate prevalence of periodontal disease in a population of dogs (*Canis familiaris*) in commercial breeding facilities in Indiana and Illinois. *PLoS ONE*. 2018;13(1):e0191395.

Takeuchi K, Matsumoto K, Furuta M, Fukuyama S, Takeshita T, Ogata H, Suma S, Shibata Y, Shimazaki Y, Hata J, Ninomiya T, Nakanishi Y, Inoue H, Yamashita Y. Periodontitis Is Associated with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Dent Res*. 2019; 98(5):534–540.

Thorstensson H, Kuylensstiema J, Hugoson A. Medical Status and complications in relation to periodontal disease experience in insulin-dependent diabetics. *J Clin Periodontol*. 1996; 23(3):194–202.

Tizard IR. *Imunologia Veterinária*. 2009; Elsevier, Rio de Janeiro.

Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018;89:S159–72.

Van Nice E. Management of Multiple Dental Infections in a Dog with Diabetes Mellitus. *J Vet Dent*. 2006;23(1):18–25.

Venturini MAFA. Estudo retrospectivo de 3055 animais atendidos no ODONTOVET (Centro odontológico veterinário) durante 44 meses. Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina

Verterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo; 2006.

Zhou QB, Xia WH, Ren J, Yu BB, Tong XZ, Chen YB, Chen S, Feng L, Dai J, Tao J, et al. Effect of intensive periodontal therapy on blood pressure and endothelial microparticles in patients with prehypertension and periodontitis: a randomized controlled trial. *J Periodontol*. 2017; 88(8):711–722.

Wallis C, Pesci I, Colyer A, et al. A longitudinal assessment of periodontal disease in Yorkshire terriers. *BMC Vet Res*. 2019;15(1):207.

Waner T, Harrus S. Anemia of inflammatory disease. *Schalm's veterinary hematology*. In: Feldman, B V, Zinkl, JG, Jain, NC. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

Webster CR. History, clinical signs, and physical findings in hepatobiliary disease. *Textbook of veterinary internal medicine: disease of the dog and cat*. In: Ettinger, SJ, Feldman, EC. 6 ed. Saint Louis: Elsevier Saunders Co; 2005.

Weildliich P. Biofilme e Calculo Dental. In: Brunetti M, Fernandes M, Moraes R. *Fundamentos da periodontia: Teoria e Prática*. São Paulo: Editora Artes Médicas; 2007.

Wolf H, Rateitschak K, Hassell T. Pathogenesis—reactions and defense capabilities of the host. In: Wolf HF, Rateitschak-Pluss E. 3 ed. *Color atlas of dental medicine: periodontology*. Thieme; 2005.

ANEXOS

A. Parecer de aprovação do CEUA



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 21 de junho de 2018.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01250 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: EFEITO DA DOENÇA PERIODONTAL SOBRE INFLAMAÇÃO SISTÊMICA E SENSIBILIDADE INSULÍNICA

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

JAIR RONDINI ENGRACIA FILHO

EQUIPE DE PESQUISA

REBECA BACHI VILLANOVA; JAIR RONDINI ENGRACIA FILHO; NARÉUS SIMAS DE CARVALHO HARRISON; PATRICIA REGINA ERDMANN MOSKO

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CURSO

Escola Ciências da Vida – Medicina Veterinária

VIGÊNCIA DO PROJETO	08/2018 a 03/2018	QUANTIDADE DE ANIMAIS	40
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Canis lupus</i>	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	M/F	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	Variados	ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS (de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	CLINIVET	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi **APROVADO** pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório à CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo.

Atenciosamente,
Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais



Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br

B. Normas da revista *Research in Veterinary Science*



RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE

The Official Journal of the [Association for Veterinary Teaching and Research Work](#)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 0034-5288

DESCRIPTION

Research in Veterinary Science is an International multi-disciplinary journal publishing original articles, reviews and short communications of a high scientific and ethical standard in all aspects of veterinary and biomedical research.

The primary aim of the journal is to inform veterinary and biomedical scientists of significant advances in veterinary and related research through prompt publication and dissemination. Secondly, the journal aims to provide a general multi-disciplinary forum for discussion and debate of news and issues concerning veterinary science. Thirdly, to promote the dissemination of knowledge to a broader range of professions, globally.

High quality papers on all species of animals are considered, particularly those considered to be of high scientific importance and originality, and with interdisciplinary interest. The journal encourages papers providing results that have clear implications for understanding disease pathogenesis and for the development of control measures or treatments, as well as those dealing with a comparative biomedical approach, which represents a substantial improvement to animal and human health.

Studies without a robust scientific hypothesis or that are preliminary, or of weak originality, as well as negative results, are not appropriate for the journal. Furthermore, observational approaches, case studies or field reports lacking an advancement in general knowledge do not fall within the scope of the journal.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Research Workers in Veterinary Science

IMPACT FACTOR

2018: 1.751 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2019

ABSTRACTING AND INDEXING

Scopus
PubMed/Medline
Embase
BIOSIS Biological Abstracts
Chemical Abstracts
Current Contents
Index Veterinarius

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

P. Pasquali, Department of Veterinary Public Health and Food Safety, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

Scientific Editors

S. Almeria, Laurel, Maryland, United States
J. Álvarez, Madrid, Spain
R. Breathnach, Dublin, Ireland
C. Crouch, Walton, Milton Keynes, United Kingdom
G. Di Guardo, Teramo, Italy
M.J. Francis, Amersham, United Kingdom
G. Gabai, Legnaro, Italy
K. Hoelzer, Philadelphia, Pennsylvania, United States
D. J. Hurley, Athens, Georgia, United States
R.M. La Ragione, Guildford, United Kingdom
S. Martinez-Subiela, Murcia, Spain
C. Palmieri, Gatton, Australia
M. Santin-Duran, Baltimore, MD, United States

GUIDE FOR AUTHORS

Research in Veterinary Science publishes original contributions and review articles on research concerning the health and disease of animals, including studies in comparative medicine.

Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Short Communications
3. Review articles
4. Letters to the Editor
5. Perspectives
6. Commentary

Original research papers

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Short Communications

Short Communications should not exceed 1600 words and include no more than two tables or figures. They should have an abstract but no other divisions. Typescripts should be clearly marked Short Communication.

Review articles

Review articles on veterinary topics are invited for publication. They should give an update on recent advances in a particular field and be targeted at research veterinarians who are not necessarily working in the same field. The length should not exceed 4000 words.

Letters to the Editor

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Perspectives

Perspectives should highlight topics focusing on recent developments in an area, with particular emphasis on those aspects that are of greatest interest and/or significance. Perspectives should be based mainly on a personal viewpoint so up to three authors are allowed. These submission must have fewer than 1200 words, one figure or table and no more than ten references. An abstract is not required.

Submission checklist

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

Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

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

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Animal Welfare

Before papers describing animal studies are accepted for publication in Research in Veterinary Science, the authors must satisfy the editors that the work conformed to appropriate ethical standards. Whether or not a particular piece of work is accepted for publication will be decided by the editors whose decision will be final.

The authors should provide written assurances that: (i) The project underwent ethical review and was given approval by an institutional animal care and use committee or by appropriately qualified scientific and lay colleagues. (ii) The care and use of experimental animals complied with local animal welfare laws, guidelines and policies.

The editors expect authors to have adhered to the following general principles: (i) Alternative procedures that replace the use of animals should be used if possible. Where this is not possible, the animals used should be carefully selected to be the least sentient species possible and of an appropriate strain. (ii) The minimum number of animals should be used consistent with achieving the scientific objectives of the study. (iii) Pain and distress should be minimised by the use of humane endpoints, sedation, anaesthesia, analgesia and post-operative care. (iv) Access to veterinary care must be available at all times. (v) Investigators and personnel that care for and use animals must be trained and possess relevant expertise and training that should be updated regularly. (vi) If animals have to be killed, this should be done humanely according to local euthanasia regulations, such as the Home Office guidelines in the UK or guidelines of the American Veterinary Association Panel on Euthanasia.

Declaration of interest

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

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in

English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Use of inclusive language

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

Changes to authorship

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

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

Article transfer service

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

[More information.](#)

Copyright

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

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

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

Author rights

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

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

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

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 2600**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors are requested to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

For queries concerning the submission process or journal procedures please visit the [Elsevier Support Center](#). Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.elsevier.com/profile/api/navigate/RVSC>.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

Use of Word Processing Software

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

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Form of papers

Introduction

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

Material and methods

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

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

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

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

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

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

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

Abstract, self-contained and embodying the main conclusions. It should note the relevance to veterinary science as well as the aims and objectives of the work. Sentences such as 'the results are discussed', which merely describe the paper, are not allowed.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

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

Abbreviation and symbols

Authors are asked to explain each scientific abbreviation at its first occurrence in their papers; for example, complement fixation test (CFT). The policy of the journal with respect to units and symbols is that SI (System International) symbols should be used.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Formatting of funding sources

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

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

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

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

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

Nomenclature

1. Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. Virologists should consult the latest Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses for proper nomenclature and spelling.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.
5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺, not as Ca⁺⁺.
6. Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ¹⁸O.
7. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P₂O₅).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Artwork

General points

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

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

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

Formats

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

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

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

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

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

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

Please do not:

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

1. All illustrations (line drawings and photographs) must be submitted as separate files.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible, any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
6. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
7. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations

are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Illustration services

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

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Please ensure each table is submitted as a separate file. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Please ensure each table is submitted as a separate file. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Manuscript Formatting

Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing**, throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscripts, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

References

Data references

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

Reference management software

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

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

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/research-in-veterinary-science>

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

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

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

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

Examples:

Reference to a journal publication:

Foster, N., Berndt, A., Lalmanach, A.C., Methner, U., Pasquali, P., Rychlik, I., Velge, P., Zhou, X., Barrow, P., 2012. Emergency and therapeutic vaccination—is stimulating innate immunity an option? *Res. Vet. Sci.* 93, 7–12.

Reference to a book:

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

Reference to a chapter in an edited book:

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

For reference style 2 Harvard: [dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Supplementary material

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

Research data

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

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

Data linking

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

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

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

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

Mendeley Data

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

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

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

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

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

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

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

Offprints

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

Additional information

Authors can also keep track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage <https://www.elsevier.com/locate/rvsc>. For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.