

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ODONTOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DE LESÕES PERIAPICAIS E ANÁLISE
DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM RATOS PRÉ-DIABÉTICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Natália Brezolin Zago

Santa Maria, RS, Brasil

2014

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DE LESÕES PERIAPICAIS E ANÁLISE DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM RATOS PRÉ-DIABÉTICOS

Natália Brezolin Zago

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Odontologia, Ênfase em Endodontia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Odontológicas**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Souza Bier

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DE LESÕES PERIAPICAIS E ANÁLISE
DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM RATOS PRÉ-DIABÉTICOS**

elaborada por
Natália Brezolin Zago

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Odontológicas com Ênfase em Endodontia

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Carlos Alexandre Souza Bier, Dr.
(Presidente/Orientador)(UFSM)**

Carlos Frederico Wolle, Dr(UNIFRA)

Renata Dornelles Morgental, Dra (UFPEL)

Santa Maria, 8 de agosto de 2014.

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, Maria Brezolin Zago e Marcos Antônio Zago, por terem me dado educação, valores e pelo apoio incansável de sempre. O incentivo de vocês é o que me dá vontade de querer mais e sempre seguir em busca dos meus sonhos. Vocês são minhas referências em tudo, o meu orgulho, o meu porto seguro. Amo vocês.

Ao meu irmão, Bruno Brezolin Zago, por se orgulhar de mim e estar sempre por perto, me apoiando nas horas mais difíceis e tendo a sua paciência única de me aguentar quando a irritação toma conta. Obrigada irmão, eu te amo muito.

Ao meu namorado, Luciano Oliveira Castillo, pela compreensão, amizade e conselhos de sempre. Por estar comigo nos cuidados com os 'ratinhos', independentemente da hora da madrugada. Sou muito grata de ter você em minha vida. Te amo, amor.
Agradeço...

Primeiramente a Deus, pela vida e pela sua presença constante ao meu lado.

Ao meu pai, à minha mãe, ao meu irmão e ao meu namorado, que me acompanham de perto e sempre me incentivaram a prosseguir nesta caminhada.

A toda a minha família, que sempre torceu por mim.

Ao meu professor e orientador Carlos Alexandre Souza Bier, pelo excelente professor que é, pelo compromisso, incentivo, dedicação e paciência de sempre. Acreditou em mim do início ao fim e foi parceiro em todos os momentos, dedicou muito do seu tempo em idas e vindas a Porto Alegre, e se fez presente em todos os momentos em que mais precisei na pesquisa.

Ao meu professor, o 'Brilhante' Carlos Frederico Wolle, por ter o dom de ensinar, ter acreditado em mim, ter uma incansável vontade de ajudar, companheiro em todas as horas, guia número um nas viagens a capital gaúcha. Obrigada, Chico.

À professora Maria Martha Campos, pela sua inteligência invejável, por ter me acolhido da melhor maneira possível na PUCRS, incentivando, acompanhando e ajudando em todos os passos dados na pesquisa. Muito obrigada.

À colega e amiga, Camilla dos Santos Tiburcio Machado, pelo companheirismo, parceria e amizade que construímos desde que nos conhecemos, criando um laço mais forte durante o mestrado e podendo trabalhar juntas do início ao fim da pesquisa. Obrigada, Ca.

À colega Pauline, pela sua dedicação e ajuda no experimento, sempre disposta, independentemente de qualquer coisa. Obrigada, Paulaner.

Aos colegas de turma que participaram dessa trajetória, com trocas de conhecimento, amizade e companheirismo.

À Mariana Bello, pela amizade, troca de conhecimento e disponibilidade de ajudar. Valeu, Mari.

Às minhas velhas e queridas amigas, que sempre demonstraram preocupação e curiosidade a respeito do meu trabalho. Obrigada, 'SPCI'.

Ao meu cunhado Lourenço Castillo e a minha amiga Luiza Weis, por me receber e acolher muito bem em Porto Alegre.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas pela oportunidade de realizar o mestrado e pelo aprendizado durante o curso.

A toda equipe de mestres que estiveram presentes nesta caminhada, pelo conhecimento, aprendizado e troca de experiências no decorrer do curso. Principalmente, ao Professor Carlos Heitor Moneira, pela ajuda na estatística e atenção sempre em que precisei.

Aos funcionários da UFSM, em especial a secretária Jéssica, pela disposição e ajuda de sempre.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, pelo acolhimento, pela disponibilidade dos laboratórios, organização e q

Enfim, a todos que estiveram presentes no decorrer do curso, independente da forma e etapa.

“A morte do homem começa no instante em que ele desiste de aprender.”

(Albino Teixeira)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DE LESÕES PERIAPICAIS E ANÁLISE DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM RATOS PRÉ-DIABÉTICOS

AUTORA: NATÁLIA BREZOLIN ZAGO
ORIENTADOR: CARLOS ALEXANDRE SOUZA BIER
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 8 de agosto de 2014.

Introdução: O objetivo desse trabalho de pesquisa foi comparar radiograficamente as lesões periapicais em dentes de ratos diabéticos e não diabéticos e fazer uma análise das diferenças metabólicas desses animais. **Métodos:** Foram utilizados 16 ratos machos Wistar divididos em dois grupos: no grupo I (n=8) os ratos receberam ração e água filtrada; no grupo II (n=8) os ratos receberam ração hipercalórica, durante o período de 10 semanas. Após 6 semanas do início da administração da dieta, lesões periapicais foram induzidas nos primeiros molares inferiores, com abertura coronária, remoção da polpa e exposição do canal radicular ao meio bucal por um período de 28 dias. Após este período, os animais foram eutanasiados, foi feita a coleta sanguínea, remoção do fígado, remoção da gordura abdominal, posteriormente, a mandíbula foi removida para realização da análise radiográfica. Os dados foram submetidos à análise estatística com nível de significância fixado em $\alpha=0.05$. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste T-Student. **Resultados:** Não houve diferença estatística entre ratos diabéticos e não diabéticos ($P>0.05$) para análise radiográfica. Na análise sanguínea foi observada diferença estatística entre ratos diabéticos e não diabéticos ($P<0.05$) no nível de catalase, pesagem semanal e consumo de ração. **Conclusão:** A indução da diabetes com uma dieta hipercalórica, por um período de 10 semanas não demonstrou diferenças nos tamanhos das lesões periapicais avaliadas nesses animais. Além disso, as diferenças metabólicas nesses animais não foram observadas, com exceção do nível de catalase, pesagem semanal e consumo de ração.

Palavras-chave: Radiologia. Endodontia. Diabetes. Glicemia. Periodontite Apical.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post Graduate Program in Dental Science
Santa Maria Federal University

RADIOGRAPHIC EVALUATION OF PERIAPICAL INJURIES AND ANALYSIS METABOLIC CHANGES IN RATS PRE-DIABETIC

AUTHOR: NATÁLIA BREZOLIN ZAGO
ADVISOR: CARLOS ALEXANDRE SOUZA BIER
Place and Date of Defense: Santa Maria, August 8th, 2014.

Introduction: The aim of this research work was to compare the radiographic periapical lesions in teeth of diabetic and nondiabetic rats and do an analysis of the metabolic differences of these animals. **Methods:** 16 male Wistar rats divided into two groups: Group I (n = 8) group rats received chow and filtered water; Group II (n = 8) rats received hypercaloric diet during a 10-week period. After 6 weeks the start of administration of the diet, periapical lesions were induced in the first molars with coronary opening, pulp removal and root canal exposure to the oral environment for a period of 28 days. After this period, the animals were euthanized, blood was made collection was performed, followed by liver and abdominal fat removal and, subsequently, the mandible was removed to perform radiographic analysis. Data were subjected to statistical analysis with a significance level set at $\alpha=0.05$. The difference between groups was analyzed by Student's t-test. **Results:** There was no statistical difference between diabetic and nondiabetic rats ($P>0.05$) in radiographic analysis. In blood test statistical difference between diabetic and non-diabetic mice ($P<0.05$) in the level of catalase cosumo weekly weighed and feed was observed. **Conclusion:** The induction of diabetes with a high calorie diet for a period of 10 weeks did not show differences in the sizes of periapical lesions evaluated in these animals. In addition, the metabolic differences in these animals were not observed, except in the level of catalase, weekly weighing and feed intake.

Keywords: Radiology.Endodontics.Diabetes.Blood Glucose. Apical periodontitis.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
OBJETIVO GERAL	12
ARTIGO – AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DE LESÕES PERIAPICAIS E ANÁLISE DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM RATOS PRÉ-DIABÉTICOS	13
Abstract	15
Introdução	16
Materiais e Métodos	16
Modelos Animais.....	16
Modelo de diabetes do tipo 2.....	17
Indução das lesões periapicais.....	17
Curva Glicêmica.....	17
Eutanásia.....	17
Análise Sanguínea.....	17
Peso do fígado e gordura abdominal.....	18
Estresse Oxidativo.....	18
Análise Radiográfica.....	18
Análise Estatística.....	18
Resultados	18
Discussão	22
Conclusão	23
Agradecimentos	23
Referências Bibliográficas	24
CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
REFERÊNCIAS	28
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	30
ANEXO B -Normas para publicação no periódico <i>Journal of Endodontics</i>	31

INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, o número de pacientes portadores de doenças sistêmicas tem aumentado consideravelmente em diversos países. A diabetes mellitus é uma doença sistêmica, que afeta cerca de 151 milhões de pessoas em todo o mundo e não há cura conhecida (IWAMA et al., 2006).

O início da doença é caracterizado pela resistência à insulina, o que leva a uma parada na produção dessa enzima, ocasionando um aumento nos níveis glicêmicos. Evidências recentes indicam que tanto os seres humanos, quanto os animais podem desenvolver diabetes por infecções virais e podem possuir prole geneticamente predisposta (YOON et al., 1990). A doença é particularmente importante para pacientes que desenvolvem infecções, pois o paciente está mais vulnerável, e há uma maior probabilidade de desenvolver infecções mais graves (TENNENBERG, FINKENAUER e DWIVEDI, 1999) pela perturbação na absorção de insulina. Essa vulnerabilidade é causada por um distúrbio circulatório generalizado, atribuída a uma falta de insulina, que controla o metabolismo da glicose, como uma resultante inadequada do fornecimento de sangue para as regiões de lesão (CASEY et al., 1990). Além disso, o aumento do nível de glicose no sangue pode aumentar a multiplicação bacteriana com morte celular e apoptose final e remover leucócitos com recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (LILES e KELBANOFF, 1995).

Existem dois principais tipos de Diabetes Mellitus, o tipo 1, que acomete 5-10% da população de diabéticos e está associada a um defeito ou uma morte das células beta, as células produtora de insulina nas ilhotas de Langerhans do pâncreas, praticamente cessando a produção de insulina. Esse tipo de diabetes possui forte predisposição genética e foi originalmente conhecida como diabetes mellitus insulino-dependente, onde o paciente necessita insulina exógena para a sobrevivência (KIDAMBI e PATEL, 2008). Geralmente atinge crianças e indivíduos jovens até os 30 anos de idade, podendo, em alguns casos, ser diagnosticado posteriormente. Os principais sintomas são poliúria, polifagia, polidipsia, irritabilidade, sede e fome excessivas, os quais são reduzidos com a aplicação de doses adequadas de insulina (MILEY e TEREZHALMY, 2005).

O outro tipo de diabetes é o tipo 2, que corresponde a 90% dos casos de diabetes, anteriormente conhecida como diabetes não-insulino-dependente, sendo o tipo mais comum. Isto ocorre devido a uma disfunção das células beta ou resistência

à insulina, onde há produção de insulina, porém sua ação é dificultada. Está relacionada com má-alimentação, sedentarismo e aumento de peso, além de outros fatores, como: hipertensão arterial, tabagismo, consumo de álcool, diabetes gestacional, estresse e depressão (MANFREDI et al., 2004). O tratamento para este tipo de diabetes inclui perda de peso e aumento da atividade física, porém alguns pacientes necessitam de tratamento com hipoglicemiantes orais e, em alguns casos, administração de insulina para controle glicêmico. (KIDAMBI e PATEL, 2008).

Existem também, algumas origens mais raras da diabetes, que decorrem de fatores, como: defeito genético nas células beta, resistência à insulina determinada geneticamente, doenças no pâncreas, defeitos hormonais, compostos químicos ou fármacos, reações infecciosas e síndromes genéticas (KIDAME e PATEL, 2008; AMERICAN DIABETIC ASSOCIATION, 2005).

Os pacientes diabéticos também apresentam estado anormal de antioxidante e excesso de proteína glicada (NAWALE, MOURYA e BHISE, 2006). O estresse oxidativo no diabetes leva a danos do tecido, com a peroxidação de lipídeos e a inativação de proteínas, levando ao aumento da reação de oxidação no sistema de defesa celular e aumento do nível de espécies reativas de oxigênio. A oxidação é uma reação química que transfere elétrons ou hidrogênio de uma substância para outra. As reações de oxidação podem produzir radicais livres. Por sua vez, estes radicais podem dar início a reações em cadeia que, quando ocorrem dentro das células, podem danificá-las ou causar a sua morte. Tais reações são prejudiciais e representam um fator importante no aparecimento e progressão da diabetes e suas complicações (CAMERON et al., 1994).

Em odontologia, a relação entre saúde oral e diabetes mellitus é um assunto que tem sido extensivamente estudado, particularmente no que diz respeito à doença periodontal (FOUD et al., 2002; LAMSTER et al., 2008) e à cárie dentária (FALK, HUGOSON e THOTSTENSSON, 1989). Além disso a patologia está associada à xerostomia, perda da sensação gustativa ao doce e sialose. Hoje em dia, já há uma relação dessa doença com lesões periapicais endodônticas, principalmente quando ela está com controle inadequado, causando alteração dos níveis glicêmicos e comprometendo a cicatrização ao redor dessas lesões (BRITTO et al., 2003; MAROTTA et al., 2012; CINTRA et al., 2014) Com isso, é de extrema importância a possível compreensão dos cirurgiões-dentistas a respeito da associação de doenças sistêmicas com doenças dentárias (IWAMA et al., 2006).

Essa possível ligação entre os processos inflamatórios orais crônicos (periodontite apical e doença periodontal), com a saúde sistêmica é um aspecto muito importante que vem sendo considerado, não só pelos dentistas que se questionam a respeito dos melhores tratamentos para os de pacientes doentes, como há um interesse em buscar as respostas desses questionamentos pelos pesquisadores da comunidade científica. Pacientes diabéticos que se mantêm com um controle glicêmico inadequado, podem apresentar uma maior taxa de infecção oral assintomática, assim como pacientes que mantêm um adequado controle glicêmico podem apresentar um prognóstico idêntico àqueles que não possuem a doença (BENDER e BENDER, 2003).

Assim, considerando a possibilidade de diferenças radiográficas em lesões periapicais e diferenças metabólicas em animais diabéticos e não diabéticos, justifica-se a realização do estudo.

OBJETIVO GERAL

Comparar radiograficamente as lesões periapicais em dentes de ratos saudáveis e com diabetes tipo 2 e fazer uma análise das diferenças metabólicas nesses animais.

ARTIGO – AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DE LESÕES PERIAPICAIS E ANÁLISE DE ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM RATOS PRÉ-DIABÉTICOS

Este artigo será submetido à publicação no periódico *Journal of Endodontics*, Elsevier, ISSN: 0099-2399.

Avaliação radiográfica de lesões periapicais e análise de alterações metabólicas em ratos pré-diabéticos

Natália Brezolin Zago - Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

Camilla dos Santos Tiburcio Machado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

Pauline Mastella Lang - Programa de Pós-Graduação em Endodontia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Carlos Frederico Brilhante Wolle - Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS, Brasil.

Maria Martha Campos - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Carlos Alexandre Souza Bier - Departamento de Estomatologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Autor correspondente:

Natália Brezolin Zago

Rua General Neto 823/02, Santa Maria, RS, Brasil.

CEP: 97050-241

Telefone: 0xx(55) 9613-0427

E-mail: natalia.zago@hotmail.com

Avaliação radiográfica de lesões periapicais e análise de alterações metabólicas em ratos pré-diabéticos

Resumo

Introdução: O objetivo desse trabalho de pesquisa foi comparar radiograficamente as lesões periapicais em dentes de ratos diabéticos e não diabéticos e fazer uma análise das diferenças metabólicas desses animais. **Métodos:** Foram utilizados 16 ratos machos Wistar divididos em dois grupos: no grupo I (n=8) os ratos receberam ração e água filtrada; no grupo II (n=8) os ratos receberam ração hipercalórica, durante o período de 10 semanas. Após 6 semanas do início da administração da dieta, lesões periapicais foram induzidas nos primeiros molares inferiores, com abertura coronária, remoção da polpa e exposição do canal radicular ao meio bucal por um período de 28 dias. Após este período, os animais foram eutanasiados, foi feita a coleta sanguínea, remoção do fígado, remoção da gordura abdominal, posteriormente, a mandíbula foi removida para realização da análise radiográfica. Os dados foram submetidos à análise estatística com nível de significância fixado em $\alpha=0.05$. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste T-Student. **Resultados:** Não houve diferença estatística entre ratos diabéticos e não diabéticos ($P>0.05$) para análise radiográfica. Na análise sanguínea foi observada diferença estatística entre ratos diabéticos e não diabéticos ($P<0.05$) no nível de catalase, pesagem semanal e consumo de ração. **Conclusão:** A indução da diabetes com uma dieta hipercalórica, por um período de 10 semanas não demonstrou diferenças nos tamanhos das lesões periapicais avaliadas nesses animais. Além disso, as diferenças metabólicas nesses animais não foram observadas, com exceção do nível de catalase, pesagem semanal e consumo de ração.

Palavras-chave: Radiologia. Endodontia. Diabetes. Glicemia. Periodontite Apical.

Introdução

Nos últimos anos, o número de pacientes portadores de doenças sistêmicas que procuram atendimento odontológico tem aumentado consideravelmente em diversos países. A diabetes mellitus é uma dessas doenças sistêmicas comuns, afetando cerca de 151 milhões de pessoas em todo o mundo, provocando complicações graves e debilitantes em longo prazo e não há cura conhecida(1).

Essa doença provoca uma alteração metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica, devido a uma resistência à insulina no fígado e no músculo(2). Essa alteração eleva as taxas de açúcar no sangue e está, eventualmente, à falha na disfunção de órgãos, especialmente os olhos, rins, nervos, e o sistema cardiovascular(3).

Dietas hipercalóricas têm sido utilizadas para a reprodução de modelos experimentais de diabetes. Ratos submetidos a essa dieta mostram um aumento dos distúrbios no perfil lipídico(4) e alterações nos níveis de insulina no sangue(5). Alguns fatores clínicos podem estar ligados à presença de resistência à insulina como alterações de triglicerídeos, nível de colesterol, hipertensão e aterosclerose(6). Além de alterações sanguíneas, a diabetes também pode estar relacionada com o aumento de lesões periapicais. Hoje em dia, já há uma relação dessa doença com lesões periapicais endodônticas, principalmente quando ela está com controle inadequado, causando alteração dos níveis glicêmicos e comprometendo a cicatrização ao redor dessas lesões(7).

Com isso, este estudo analisou as alterações radiográficas em lesões periapicais e alterações metabólicas provocadas por uma dieta hipercalórica para indução de diabetes tipo 2 em ratos, durante dez semanas.

Materiais e Métodos

Modelos Animais

Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório publicado pelo Instituto Nacional de Saúde. A metodologia foi aprovada pelo comitê de ética em animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, com o número de protocolo 13/00360. Neste estudo, foram utilizados 16 ratos machos Wistar, pesando 150-200g no início do experimento. Eles foram alojados em condições controladas (temperatura de 22 ± 1 °C), umidade de 70% e um ciclo de claro-escuro de 12h. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas para roedores, preenchidas com maravalha de pinus (troca 3 vezes por semana), em número de 3 animais por gaiola. Os animais receberam água filtrada e ração peletizada (Nuvilab - Curitiba, PR, Brasil) a qual contém proteína, carboidrato, lipídeos, celulose, vitaminas e minerais. Já os animais do grupo de diabetes do tipo 2, receberam uma dieta hipercalórica, de acordo com o protocolo descrito posteriormente.

Modelo de diabetes do tipo 2

Para o grupo onde houve indução de diabetes tipo 2, os ratos receberam uma dieta especial. Foi utilizada uma metodologia descrita previamente na literatura(8), na qual, cada 100g de ração continha os seguintes ingredientes: 34g de leite condensado, 25g de proteína (ração triturada), 23g de amido (amido de milho), 10g de gordura (óleo de soja) e 8g de sacarose (açúcar). Essa ração foi preparada a cada sete dias para todos os animais do modelo de diabetes tipo 2 e armazenada sob refrigeração até ser colocada nas gaiolas.

Passadas as 6 semanas após o início da administração da dieta especial, as lesões periapicais foram induzidas nos primeiros molares inferiores do lado direito, tal como descrito abaixo. O peso corporal de todos os animais foi registrado semanalmente.

Indução das lesões periapicais

A indução das lesões periapicais foi realizada segundo metodologia já descrita na literatura(9,10,11). Os animais foram anestesiados através da mistura de xilazina (10 mg/kg) e quetamina (100mg/kg). Após a confirmação da anestesia, foram realizadas aberturas coronárias nos primeiros molares inferiores direitos, sob irrigação constante. A seguir, foi introduzida uma lima K #10 (Dentispily, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil) para confirmação da comunicação com a cavidade pulpar. O dente ficou com a cavidade pulpar exposta ao meio bucal por um período de 28 dias, para a indução das lesões periapicais.

Curva glicêmica

Na 9ª semana, todos os animais de ambos os grupos foram submetidos ao exame de glicemia. Foi realizada uma curva glicêmica, na qual após 16 horas de jejum, foi medida a glicose de cada animal através de um kit medidor de glicose Kit OneTouch SelectSimple (Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil). Logo após essa medição, cada animal recebeu glicose via oral 2mg/kg. Aos 30, 60 e 120 minutos após da ingestão de glicose, foram feitas novas medições, resultando em 4 níveis de glicose distintas em cada animal.

Eutanásia

Passados 70 dias desde o início do experimento incluindo 28 dias de indução da lesão periapical, os animais foram eutanasiados através da anestesia profunda com isoflurano. Depois da eutanásia, as amostras pertinentes ao estudo foram coletadas e o lixo biológico foi destinado ao setor de descarte da PUCRS.

Análise sanguínea

Imediatamente após a eutanásia, o sangue foi recolhido por punção cardíaca e transferido para um tubo contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). O plasma foi obtido por centrifugação e mantido refrigerado para posterior medição de insulina, por ensaio radioimuno (Siemens, Los Angeles, CA). O soro foi obtido em um tubo em EDTA para análise de colesterol total, hdl e triglicérides.

Peso do fígado e gordura abdominal

O fígado foi completamente removido e pesado em uma balança eletrônica para critério de comparação de peso desse órgão entre os animais diabéticos e não diabéticos. Assim, como a gordura abdominal bilateral.

Estresse oxidativo

Para ter uma confirmação mais precisa da instalação de diabetes tipo 2, o fígado foi recolhido para análise bioquímica e determinação da redução de atividade das enzimas: catalase e glutathione (GSH). Dois antioxidantes e indicadores clássicos de estresse oxidativo.

Análise radiográfica

Os animais foram submetidos à eutanásia 28 dias após a exposição pulpar e as mandíbulas do lado direito foram removidas e mantidas em formol, durante 3 dias apenas, até ser realizada a análise radiográfica. As radiografias foram realizadas de modo a formar um ângulo perpendicular com a superfície vestibular dos primeiros molares, do lado direito. Um sensor digital (Digora, Soredex, Helsinque, Finlândia) foi utilizado e o aparelho de raio-x (Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil), foi operado a 70 kVp, 8 mA, com um tempo de exposição de 0,2 segundos e uma distância focal de 30 cm. A análise de imagem foi realizada em três momentos distintos, calculando a medida de área da lesão no software Adobe Photoshop 11,0 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA), por um examinador que desconhecia os grupos experimentais.

Análise Estatística

Com base em estudos prévios da literatura(12,13) e através da utilização do programa estatístico GraphPadInstat (versão 3.1, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Estabeleceu-se um nível de significância de 0.05 e um poder de 80%. Utilizou-se o teste T-Student em todos os desfechos analisados.

Resultados

Os animais submetidos à indução do diabetes tipo 2 com a ingestão da dieta hipercalórica (HFLPMC – *high fat, low protein, moderate carbohydrate*) tiveram um aumento de peso corporal estatisticamente menor ($p < 0,05$) que os animais não diabéticos que ingeriram a dieta padrão (SD – *standard diet*). Porém, o aumento de peso foi observado nos dois grupos, assim como mostra a figura 2A e 2B.

No exame da curva glicêmica, os dois grupos tiveram um pico de glicose em 30 minutos e uma baixa constante dessa glicose nos momentos seguintes, sem diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 2C e 2D). No nível de insulina no sangue os animais com indução de diabetes apresentaram um ligeiro aumento do nível de insulina no plasma que os animais do grupo controle, sem significância estatística ($p > 0,05$) (Figura 1D).

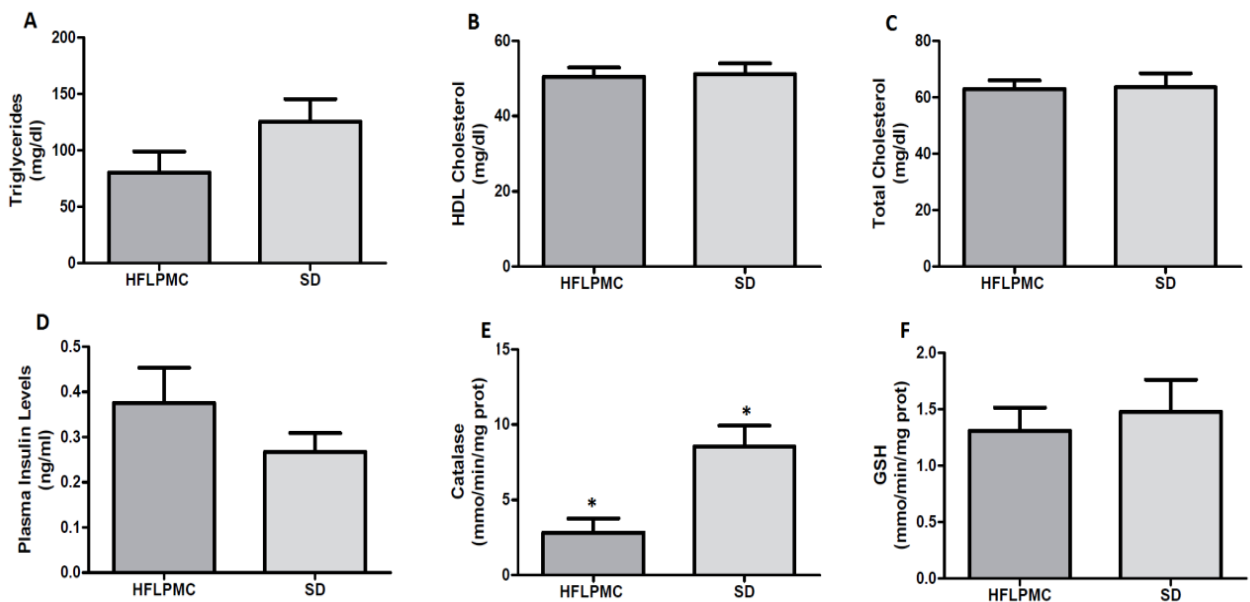


Figura 1 - Triglycerides levels (A), HDL Cholesterol (B), Total Cholesterol (C), Plasma Insulin Levels (D), Catalase (E), GSH (F) liver levels in animals submitted to hypercalorie diet. Columns represent the mean and vertical lines indicate the standard error of mean. * $P < 0,05$

Tanto os valores de colesterol total, HDL e triglicéridos (Figura 1A, 1B, 1C), quanto o peso do fígado e o peso da gordura abdominal, proporcionalmente ao tamanho dos animais (Figura 2E e 2F), não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos. Já para os níveis de catalase (Figura 1E), os animais com indução de diabetes apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de acordo com a avaliação das amostras dos fígados, em relação aos animais do grupo controle. O nível de GSH, nessas amostras, foi menor no grupo dos animais com indução da doença, do que no grupo controle, porém não foi significativo ($p > 0,05$) (Figura 1F).

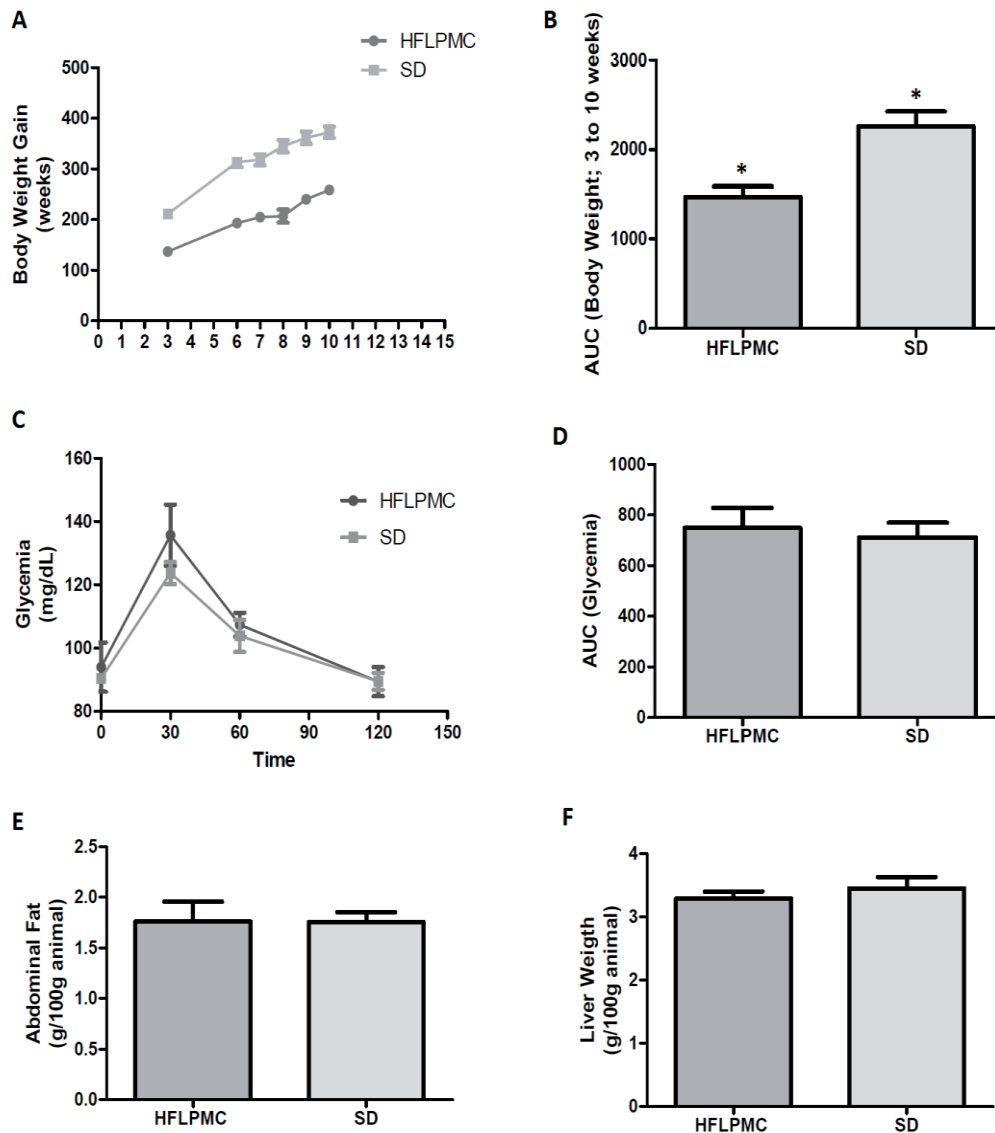


Figura 2 – Changes in total Body Weight Gain (A e B), Changes in total Glycemia (C e D) Abdominal Fat (E), Liver Weight (F). Columns represent the mean and vertical lines indicate the standard error of mean. *P<.05.

Como pode ser observado na figura 3, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre as áreas de lesões periapicais na análise radiográfica, quando comparado o grupo dos animais diabéticos com o grupo dos animais não-diabéticos.

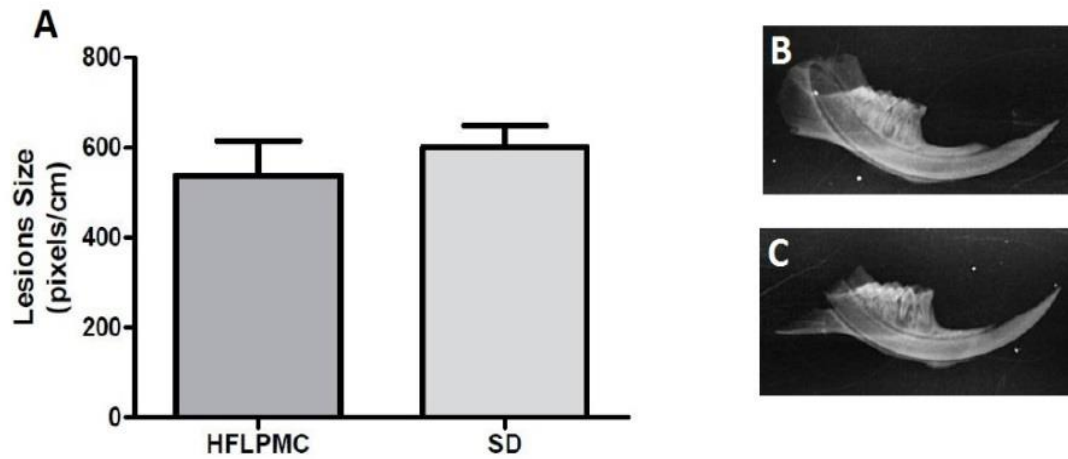


Figura 3 - Extension of radiographic are of periapical lesions (A). Columns represent the mean and vertical lines indicate the standard error of mean. Representative radiographic imagens of periapical lesions in control animals (B) and in animals submitted to hipercalorie diet (C).

Os animais que receberam a dieta hipercalórica tiveram um consumo de ração estatisticamente menor ($p < 0.05$) que os animais que receberam apenas a dieta padrão (Figura 4).

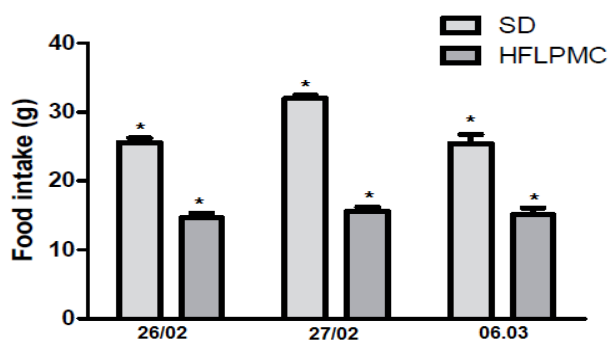


Figura 4 - Feed intake for three days in experiment. Columns represent the mean and vertical lines indicate the standard error of mean. * $P < 0.05$.

Discussão

As complicações orais que podem ocorrer em pacientes diabéticos têm sido um foco de bastante interesse nas pesquisas não só em Odontologia, como nas diversas áreas da saúde. Neste estudo, o desenvolvimento de lesões periapicais e as alterações metabólicas foram avaliados em ratos com indução de diabetes tipo 2. As vantagens de se utilizar modelos animais se deve ao fato deles serem criados e produzidos sob condições ideais, mantidos em um ambiente controlado, com monitoramento e acompanhamento regular(14).

Foi observado que os ratos com indução de diabetes submetidos à dieta hipercalórica, por período de 10 semanas, apresentaram uma diminuição estatística de peso corporal, comparados aos ratos controles. Ao final de 10 semanas de experimento, os ratos diabéticos, continuaram apresentando massa corporal final menor que os animais sem a doença. Isso pode ser explicado pelo trabalho de Schrauwen et al., 2000(15), que relatou que a ingestão de uma dieta rica em calorias pode provocar uma falta de ajuste de oxidação de gordura em curto prazo, mas que essa oxidação se ajusta em longo prazo, aumentando o peso corporal. Um consumo de dieta rica em calorias pode contribuir para uma hiperfagia(29), porém esse estudo mostrou que o consumo de ração foi estatisticamente menor no grupo de animais diabéticos, um dado também reportado por Kretschmer et al(30), onde os animais com ingestão de uma dieta rica em gordura conseguiram compensar o valor energético consumindo uma menor quantidade de ração.

Os resultados existentes na literatura referentes à massa corporal de ratos diabéticos são bem variáveis(4,8), isso se deve, provavelmente, ao tempo estimado da dieta em cada estudo, ou ao período do início da dieta(16,17). Contribuindo para esse menor ganho corporal nos ratos com indução de diabetes, o peso da gordura abdominal e do fígado, nesses animais, não apresentou diferença. Sendo que, há muito tempo a obesidade é um fator de risco do diabetes tipo dois(18) e vem sendo relacionada com um aumento do tamanho dos órgãos e da gordura abdominal dos portadores(19).

O início da diabetes tipo 2 é caracterizado por uma resistência à insulina, o que contribui para uma superprodução desse hormônio, devido à ingestão elevada de glicose. Esse dado vai de acordo com o trabalho de Wolle et al. 2013(7), em que também observou um nível elevado de insulina em ratos com indução de diabetes tipo 2, onde esse nível só foi diminuído devido o tratamento com o antioxidante tempol.

Em todos os momentos da curva glicêmica, os animais com indução de diabetes apresentaram um nível de glicose mais elevado que os animais da dieta padrão. Curiosamente, não houve diferença entre os grupos. Observamos o pico hiperglicêmico logo após a ingestão de glicose (30 min pós-prandial) e a diminuição constante dessa glicose (60, 120 min pós-prandial) nos dois grupos. Alguns estudos mostram que no diabetes tipo 2, a glicêmica pós-prandial é maior e mais prolongada, fazendo com que esses indivíduos estejam a maior parte do tempo no estado pós-prandial(20,21). Já no presente estudo, a captação de glicose superou a produção,

fazendo com que a glicemia voltasse ao normal, tanto nos ratos com indução de diabetes, quanto nos ratos da dieta controle.

Foi estatisticamente comprovada a diminuição da catalase e visivelmente visto a diminuição de GSH em ratos com indução de diabetes, contribuindo para a ocorrência do estresse oxidativo nesses animais. Esse dado está reportado em inúmeros estudos com o mesmo modelo de doença(22,23,24) e indica um desequilíbrio entre moléculas antioxidantes e oxidantes no interior das células. Outro fator que contribui para esse desequilíbrio são alterações nos níveis de colesterol total e HDL²⁵. No presente estudo, não foi encontrada diferença entre os grupos para esses níveis. Eles se mantiveram parecidos, indo contra alguns estudos(26,27,28) que indicam que alterações em partículas de lipoproteínas são evidentes em diabéticos tipo 2. Os níveis de triglicérides, surpreendentemente, foram menores nos animais com indução de diabetes. Tais dados nos indicam que, talvez, o tempo da indução da doença com a referida dieta, não foi suficiente para alterações sanguíneas visíveis.

A análise dos resultados mostrou também, que os ratos com indução de diabetes não apresentaram um aumento visível das lesões periapicais observada em tomadas radiográficas. Nossos resultados são semelhantes ao estudo de Wolle et al. 2013(7), que reportou esse mesmo índice, em animais diabéticos tipo 2, induzidos com administração de glicose. Já Armada-Dias et al, 2006(11), demonstrou, que em ratos diabéticos tipo um induzidos por estreptozocina, ocorreu um aumento significativo das lesões periapicais em relação ao grupo controle.

Em resumo, o presente estudo mostrou que a ingestão contínua de uma dieta hipercalórica durante 10 semanas, foi um fator contribuinte para um início de diabetes, porém o tempo de indução foi pequeno para ocasionar diferenças estatísticas no soro e plasma desses animais. Também não foi observado um aumento estatístico no tamanho das lesões periapicais.

Conclusão

A indução da diabetes com uma dieta hipercalórica, por um período de 10 semanas não demonstrou diferenças nos tamanhos das lesões periapicais avaliadas nesses animais. Além disso, as diferenças metabólicas nesses animais não foram observadas, com exceção do nível de catalase, pesagem semanal e consumo de ração. Desse modo, sugere-se uma dieta hipercalórica administrada por um período maior, para tentar se observar as diferenças não vistas nesse estudo.

Agradecimentos

Os autores desse estudo agradecem a Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul no desenvolvimento experimental e a contribuição do Prof. Dr. Carlos Heitor Cunha Moreira na realização da análise estatística deste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Iwama A, Morimoto T, Tsuji M, Nakamura K, Higuchi N, Imaizumi I. Increased number of anaerobic bacteria in the infected root canal in type 2 diabetic rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 May;101(5):681-6.
2. Deshpande AD, Harris-Hayes M, Schootman M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther.* 2008 Nov;88(11):1254-64.
3. Vinik AI, Vinik E. Prevention of the complications of diabetes. *Am J Manag* 2003 Mar;9(3):63-80.
4. Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition.* 2004; 20(2):218-24.
5. Prada PO, Zechin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE. Western diet modulates insulin signaling, activity and IRS-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology.* 2005; 146(3):1576-87.
6. Fujimoto WY. The importance of insulin resistance in the pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Am J Med.* 2000; 108(6A):9S-14S.
7. Wolle CF, Zollmann LA, Bairros PO, et al. Outcome of periapical lesions in a rat model of type 2 diabetes: refractoriness to systemic antioxidant therapy. *J Endod.* 2013;39(5):643-7
8. Souza CG, Moreira JD, Siqueira IR, Pereira AG, Rieger DK, Souza DO, Souza TM, Portela LV, Perry MLS. Highly palatable diet consumption increases protein oxidation in rat frontal cortex and anxiety-like behavior. *Life Sciences* 81 (2007) 198–203.
9. Wolle CFB, Zollmann LA, Etges A, et al. Effects of the antioxidant agent tempol on periapical lesions in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Endod.* 2012; 38:191–5.
10. Iwama A, Nishigaki N, Nakamura K, Imaizumi I, Shibata N, Yamasaki M, et al. The effect of high sugar intake on the development of periradicular lesions in rats with type 2 diabetes. *J Dent Res.* 2003;82(4):322-5.
11. Armada-Dias L, Breda J, Provenzano JC, Breitenbach M, Rocas IN, Gahyva SM, et al. Development of periradicular lesions in normal and diabetic rats. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(5):371-5.

12. Wagner C BVJ, de Oliveira SD, Campos MM. Effectiveness of the proton pump inhibitor omeprazole associated with calcium hydroxide as intracanal medication: an in vivo study. *J Endod*. 2011;37(9):1253-57.
13. Scarparo RK, Dondoni L, Bottcher DE, Grecca FS, Rockenbach MI, Batista EL Jr. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: na experimental model in rat molars. *J Endod* 2011;37:1069–73.
14. Andrade A, Pinto SC, oliveira RS. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. Available from SciELO Books.
15. Schrauwen P, Westerterp KR. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr* 2000;84:417.
16. Kusunoki M, Storlien LH, MacDessi J, Oakes ND, Kennedy C, Crisholm DJ, et al. Muscle glucose uptake during and after exercise in normal in insulin-resistant rats. *Am J Physiol*. 1993; 264(27):E167-72.
17. Kim CH, Youn JH, Park, JY, Hong SK, Park KS, Park SW, Suh KI, Lee KU. Effects of high-fat diet and exercise training on intracellular glucose metabolism in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278: E977–E984.
18. Yamada K, Ishiyama-Shigemoto S, Ichikawa F, Yuan X, Koyanagi A, Koyama W, Nonaka K. Polymorphism in the 50-leader cistron of the b2-adrenergic receptor gene associated with obesity and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1754–1757.
19. Lange LA1, Norris JM, Langefeld CD, Nicklas BJ, Wagenknecht LE, Saad MF and Bowden DW. Association of adipose tissue deposition and beta-2 adrenergic receptor variants: the IRAS family study *International Journal of Obesity* (2005) 29, 449–457.
20. Polonsky KS, Given BD, Hirsch LJ, et al. Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1988; 318: 1231-39.
21. Service FJ, Hall LD, Westland RE, et al. Effects of size, time of day and sequence of meal ingestion on carbohydrate tolerance in normal subjects. *Diabetologia* 1983; 25: 316-21.
22. Dias JP, Talbot S, Senecal J, et al. Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. *PLoS One* 2010;5:e12622.
23. Leite MF, Lima A, Massuyama MM, Otton R. In vivo astaxanthin treatment partially prevents antioxidant alterations in dental pulp from alloxaninduced diabetic rats. *International Endodontic Journal* 2010; 43, 959–967.

24. Ismael MA, Talbot S, Carbonneau CL, Beausejour CM, Couture R. Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetyl-L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. *Eur J Pharmacol.* 2008 Jul 28;589(1-3):66-72.
25. Kruit JK, Brunhama LR, Bruce C, Verchereb, Michael R. Haydena HDL and LDL cholesterol significantly influence b-cell function in type 2 diabetes mellitus *Curr Opin Lipidol* 2010; 21:178–185.
26. Perley MJ, Kipnis DM. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 1967; 46:1954–1962.
27. Kahn SE, Zraika S, Utzschneider KM, Hull RL. The beta cell lesion in type 2 diabetes: there has to be a primary functional abnormality. *Diabetologia* 2009; 52:1003–1012.
28. Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Bore'n J. Diabetic dyslipidaemia. *Curr Opin Lipidol* 2006; 17:238–246.
29. Kim EM, Welch CC, Grace MK, Billington CJ, Levine AS. Effects of palatability-induced hyperphagia and food restriction on mRNA levels of neuropeptide Y in the arcuate nucleus. *Brain Res.* 1998; 806(1):11721.
30. Kretschmer BD, Schelling P, Beier N, Liebscher C, Treutel S, Krüger N, et al. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Science.* 2005; 76(14):155373.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo sugerem que a indução da diabetes com uma dieta hipercalórica, por um período de 10 semanas não demonstrou diferenças nos tamanhos das lesões periapicais avaliadas nesses animais. Além disso, as diferenças metabólicas nesses animais não foram observadas, com exceção do nível de catalase, pesagem semanal e consumo de ração. Desse modo, sugere-se uma dieta hipercalórica administrada por um período maior, para tentar se observar as diferenças não vistas nesse estudo.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN DIABETIC ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Position statement. **Diabetes Care**. 2005;29:S37-S42.
- BENDER, I.B.; BENDER, A.B. Diabetes mellitus and the dental pulp. **J Endod**, v.29, n.6, p.383-389, 2003.
- BRITTO, L.R.; KATZ, J.; GUELMANN, M.; HEFT M. Periradicular radiographic assessment in diabetic and control individuals. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 96, p449-52, 2003.
- CAMERON, N.E.; COTTER, M.A.; ARCHIBALD, V.; DINES, K.C.; MAXFIELD, E.K. Antioxidant and pro-oxidant effects on nerve conduction velocity, endoneurial blood flow and oxygen tension in non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats. **Diabetologia**, v.37, p.449-459, 1994.
- CASEY, J.I. Host defense and infections in diabetes mellitus. In: Rifkin H, Porte D jr, eds. Diabetes mellitus, theory and practice. **New York Amsterdam London: Elsevier**, p. 617-624, 1990.
- CINTRA, L.T.; DA SILVA FACUNDO, A.C.; PRIETO, A.K.; SUMIDA, D.H.; NARCISO, L.G.; MOGAMI BOMFIM, S.R.; SILVA, C.O.; DEZAN-JÚNIOR, E.; GOMES-FILHO, J.E. Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. **J Endod**, v. 40, p. 1139-44, 2014.
- FALK, H.; HUGOSON, A.; THOTSTENSSON, H. Number of teeth prevalence of caries and periapical lesions in insulin-dependent diabetes. **Scand JDR**, v.97, p.198-206, 1989.
- FOUAD, A.; BARRY, J.; RUSSO, J.; RADOLF, J.; ZHU, Q. Periapical Lesion Progression with Controlled microbial inoculation in a type 1 diabetic mouse model. **J Endod**, v.28, p.8-16, 2002
- IWAMA, A.; MORIMOTO, T.; TSUJI, M.; et al. Increased number of anaerobic bacteria in the infected root canal in type 2 diabetic rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.101, n.5, p.681-686, 2006.
- KIDAMBI, S.; PATEL, S.B. Diabetes mellitus: considerations for dentistry. **J Am Dent Assoc**, v. 139, p. 8S-18S, 2008.
- LAMSTER, I.B.; LALLA, E.; BORGNACKE, W.S.; TAYLOR, G.W. The relationship between oral health and diabetes mellitus. **J Am Dent Assoc**, v. 139, p.19S-24S, 2008.
- LILES, W.C.; KELBANOFF, S.J. Regulation of apoptosis in neutrophils-Fas track to death? **J Immunol**, v. 155, p. 3289-3291, 1995.

MANFREDI, M.; MCCULLOUGH, M.J.; VESCOVI, P.; AL-KAARAWI, Z.M.; PORTER, S.R. Update on diabetes mellitus and related oral diseases. **Oral Dis**, v. 10, n.4, p.187-200, 2004.

MAROTTA, P.S.; FONTES, T.V.; ARMADA, L.; LIMA, K.C.; RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F. Type 2 diabetes mellitus and the prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment in an adult Brazilian population. **J Endod**, v. 38, p 297-300, 2012.



MILEY, D.D.; TEREZHALMY, G.T. The patient with diabetes mellitus: etiology, epidemiology, principles of medical management, oral disease burden, and principles of dental management. **Quintessence Int**, v.36, n. 10, p. 779-795, 2005.

NAWALE, R. B.; MOURYA, V.K., BHISE, S. B. Non-enzymatic glycation of proteins: A cause for complications in diabetes. **Indian J. Biochem. Biophys**, v. 43, p.337-344, 2006.

TENNENBERG, S.D.; FINKENAUER, R.; DWIVEDI, A. Absence of lipopolysaccharide-induced inhibition of neutrophil apoptosis in patients with diabetes. **ArchSurg**, v. 134, p. 1229-1233, 1999.

YOON, J.W. The role of viruses and environmental factors in the induction of diabetes. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 164, p95-123, 1990.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

  Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 112/13 - CEUA Porto Alegre, 03 de dezembro de 2013.

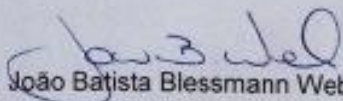
Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 13/00360, intitulado "**Diferenças entre a microbiota dos canais radiculares infectados de ratos normais diabéticos tipo 2: efeito do tratamento com metformina**".


Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Maria Martha Campos
INTOX
Nesta Universidade

 **Campus Central**
Av. Ipiranga, 6681 - P. 99 - Portal Tecnopuc - sala 1512
CEP: 90619-900 - Porto Alegre/RS
Fone: (51) 3353-6365
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO B – Normas para publicação no periódico *Journal of Endodontics*

Guidelines for Publishing Papers in the JOE

Writing an effective article is a challenging assignment. The following guidelines are provided to assist authors in submitting manuscripts.

The JOE publishes original and review articles related to the scientific and applied aspects of endodontics. Moreover, the JOE has a diverse readership that includes full-time clinicians, full-time academicians, residents, students and scientists. Effective communication with this diverse readership requires careful attention to writing style.

1. General Points on Composition

a. Authors are strongly encouraged to analyze their final draft with both software (e.g., spelling and grammar programs) and colleagues who have expertise in English grammar. References listed at the end of this section provide a more extensive review of rules of English grammar and guidelines for writing a scientific article. Always remember that clarity is the most important feature of scientific writing. Scientific articles must be clear and precise in their content and concise in their delivery since their purpose is to inform the reader. The Editor reserves the right to edit all manuscripts or to reject those manuscripts that lack clarity or precision, or have unacceptable grammar or syntax. The following list represents common errors in manuscripts submitted to the JOE:

b. The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs, sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section “c” below), or sentences with little to no transition within a paragraph.

c. Keep to the point. The subject of the sentence should support the subject of the paragraph. For example, the introduction of authors’ names in a sentence changes the subject and lengthens the text. In a paragraph on sodium hypochlorite, the sentence, “In 1983, Langeland et al., reported that sodium hypochlorite acts as a lubricating factor during instrumentation and helps to flush debris from the root canals” can be edited to: “Sodium hypochlorite acts as a lubricant during instrumentation and as a vehicle for flushing the generated debris (Langeland et al., 1983).” In this example, the paragraph’s subject is sodium hypochlorite and sentences should focus on this subject.

d. Sentences are stronger when written in the active voice, i.e., the subject performs the action. Passive sentences are identified by the use of passive verbs such as “was,” “were,” “could,” etc. For example: “Dexamethasone was found in this study to be a factor that was associated with reduced inflammation,” can be edited to: “Our results demonstrated that dexamethasone reduced inflammation.” Sentences written in a direct and active voice are generally more powerful and shorter than sentences written in the passive voice.

e. Reduce verbiage. Short sentences are easier to understand. The inclusion of unnecessary words is often associated with the use of a passive voice, a lack of

focus or run-on sentences. This is not to imply that all sentences need be short or even the same length.

Indeed, variation in sentence structure and length often helps to maintain reader interest. However, make all words count. A more formal way of stating this point is that the use of subordinate clauses adds variety and information when constructing a paragraph. (This section was written deliberately with sentences of varying length to illustrate this point.)

f. Use parallel construction to express related ideas. For example, the sentence, “Formerly, endodontics was taught by hand instrumentation, while now rotary instrumentation is the common method,” can be edited to “Formerly, endodontics was taught using hand instrumentation; now it is commonly taught using rotary instrumentation.” The use of parallel construction in sentences simply means that similar ideas are expressed in similar ways, and this helps the reader recognize that the ideas are related.

g. Keep modifying phrases close to the word that they modify. This is a common problem in complex sentences that may confuse the reader. For example, the statement, “Accordingly, when conclusions are drawn from the results of this study, caution must be used,” can be edited to “Caution must be used when conclusions are drawn from the results of this study.”

h. To summarize these points, effective sentences are clear and precise, and often are short, simple and focused on one key point that supports the paragraph’s theme.

i. Authors should be aware that the JOE uses iThenticate, plagiarism detection software, to assure originality and integrity of material published in the Journal. The use of copied sentences, even when present within quotation marks, is highly discouraged. Instead, the information of the original research should be expressed by new manuscript author’s own words, and a proper citation given at the end of the sentence. Plagiarism will not be tolerated and manuscripts will be rejected, or papers withdrawn after publication based on unethical actions by the authors. In addition, authors may be sanctioned for future publication.

2. Organization of Original Research Manuscripts

Please Note: All abstracts should be organized into sections that start with a one-word title (in bold), i.e., Introduction, Methods, Results, Conclusions, etc., and should not exceed more than 250 words in length.

a. *Title Page: The title should describe the major emphasis of the paper. It should be as short as possible without loss of clarity. Remember that the title is your advertising billboard—it represents your major opportunity to solicit readers to spend the time to read your paper. It is best not to use abbreviations in the title since this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (e.g., use “sodium hypochlorite” rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at www.icmje.org). The manuscript title, name and address (including email) of one author designated as the corresponding author. This author will be responsible for editing proofs and ordering reprints when applicable. The contribution of each author should also be highlighted in the cover letter.*

b. *Abstract: The abstract should concisely describe the purpose of the study, the hypothesis, methods, major findings and conclusions. The abstract should describe*

the new contributions made by this study. The word limitations (250 words) and the wide distribution of the abstract (e.g., PubMed) make this section challenging to write clearly. This section often is written last by many authors since they can draw on the rest of the manuscript. Write the abstract in past tense since the study has been completed. Three to ten keywords should be listed below the abstract.

c. Introduction: The introduction should briefly review the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address and the limitations of previous studies in the area. The purpose of the study, the tested hypothesis and its scope should be clearly described. Authors should realize that this section of the paper is their primary opportunity to establish communication with the diverse readership of the JOE. Readers who are not expert in the topic of the manuscript are likely to skip the paper if the introduction fails to succinctly summarize the gap in knowledge that the study addresses. It is important to note that many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals. Therefore, authors should refrain from performing extensive review of the literature, and discussing the results of the study in this section.

d. Materials and Methods: The objective of the materials and methods section is to permit other investigators to repeat your experiments. The four components to this section are the detailed description of the materials used and their components, the experimental design, the procedures employed, and the statistical tests used to analyze the results. The vast majority of manuscripts should cite prior studies using similar methods and succinctly describe the essential aspects used in the present study. Thus, the reader should still be able to understand the method used in the experimental approach and concentration of the main reagents (e.g., antibodies, drugs, etc.) even when citing a previously published method. The inclusion of a "methods figure" will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then the authors should carefully describe the method and include validation experiments. If the study utilized a commercial product, the manuscript must state that they either followed manufacturer's protocol or specify any changes made to the protocol. If the study used an in vitro model to simulate a clinical outcome, the authors must describe experiments made to validate the model, or previous literature that proved the clinical relevance of the model. Studies on humans must conform to the Helsinki Declaration of 1975 and state that the institutional IRB/equivalent committee(s) approved the protocol and that informed consent was obtained after the risks and benefits of participation were described to the subjects or patients recruited. Studies involving animals must state that the institutional animal care and use committee approved the protocol. The statistical analysis section should describe which tests were used to analyze which dependent measures; p-values should be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis as a basis for sample size computation, drop-outs from clinical trials, the effects of important confounding variables, and bivariate versus multivariate analysis.

e. Results: Only experimental results are appropriate in this section (i.e., neither methods, discussion, nor conclusions should be in this section). Include only those data that are critical for the study, as defined by the aim(s). Do not include all available data without justification; any repetitive findings will be rejected from publication. All Figures, Charts and Tables should be described in their order of numbering with a brief description of the major findings. Author may consider the use of supplemental figures, tables or video clips that will be published online.

Supplemental material is often used to provide additional information or control experiments that support the results section (e.g., microarray data).

f. *Figures:* There are two general types of figures. The first type of figures includes photographs, radiographs or micrographs. Include only essential figures, and even if essential, the use of composite figures containing several panels of photographs is encouraged. For example, most photo-, radio- or micrographs take up one column-width, or about 185 mm wide X 185 mm tall. If instead, you construct a two column-width figure (i.e., about 175 mm wide X 125 mm high when published in the JOE), you would be able to place about 12 panels of photomicrographs (or radiographs, etc.) as an array of four columns across and three rows down (with each panel about 40 X 40 mm). This will require some editing to emphasize the most important feature of each photomicrograph, but it greatly increases the total number of illustrations that you can present in your paper. Remember that each panel must be clearly identified with a letter (e.g., "A," "B," etc.), in order for the reader to understand each individual panel. Several nice examples of composite figures are seen in recent articles by Jeger et al (J Endod 2012;38:884–888); Olivieri et al., (J Endod 2012;38:1007–1011); Tsai et al (J Endod 2012;38:965–970). Please note that color figures may be published at no cost to the authors and authors are encouraged to use color to enhance the value of the illustration. Please note that a multipanel, composite figure only counts as one figure when considering the total number of figures in a manuscript (see section 3, below, for maximum number of allowable figures). The second type of figures are graphs (i.e., line drawings including bar graphs) that plot a dependent measure (on the Y axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). Examples include a graph depicting pain scores over time, etc. Graphs should be used when the overall trend of the results are more important than the exact numerical values of the results. For example, a graph is a convenient way of reporting that an ibuprofen-treated group reported less pain than a placebo group over the first 24 hours, but was the same as the placebo group for the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.

g. *Tables:* Tables are appropriate when it is critical to present exact numerical values. However, not all results need be placed in either a table or figure. For example, the following table may not be necessary:

% NaOCl	N/Group	% Inhibitio n of Growth
0.001	5	0
0.003	5	0
0.01	5	0
0.03	5	0
0.1	5	100
0.3	5	100