

FLÁVIA REGINA GONÇALVES DE ARAÚJO

DESNUTRIÇÃO NEONATAL E BACTEREMIA
EM PROCESSO DE ALVEOLITE DENTÁRIA EM RATOS:
ANÁLISE BACTERIOLÓGICA E HISTOLÓGICA

Recife, 2011

FLÁVIA REGINA GONÇALVES DE ARAÚJO

DESNUTRIÇÃO NEONATAL E BACTEREMIA
EM PROCESSO DE ALVEOLITE DENTÁRIA EM RATOS:
ANÁLISE BACTERIOLÓGICA E HISTOLÓGICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Nutrição

Orientadora: Profa. Dra. Célia Maria Machado
Barbosa de Castro

Co-orientadora: Profa. Dra. Liriane Baratella
Evêncio

Recife, 2011

Araújo, Flávia Regina Gonçalves de
Desnutrição neonatal e bacteremia em processo
de alveolite dentária em ratos: análise bacteriológica
e histológica / Flávia Regina Gonçalves de Araújo. –
Recife: O Autor, 2011.

158 folhas: il., fig.,; 30 cm

.
Orientador: Célia Maria Machado Barbosa de
Castro

Tese (tese) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Nutrição, 2011.

Inclui bibliografia, anexos e apêndice.

**1. Desnutrição. 2. Bacteremia. 3. Alveolite
dentária. 4. Microbiota peri-alveolar. 5. Cicatrização
alveolar. I. Castro, Célia Maria Machado Barbosa de.
II. Título.**

616.39

CDD (20.ed.)

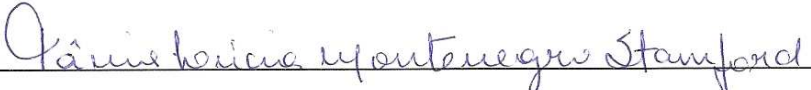
UFPE
CCS2011-054

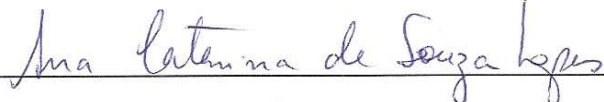
FLÁVIA REGINA GONÇALVES DE ARAÚJO

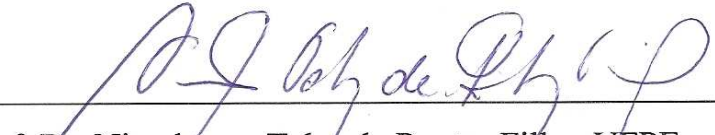
DESNUTRIÇÃO NEONATAL E BACTEREMIA
EM PROCESSO DE ALVEOLITE DENTÁRIA EM RATOS:
ANÁLISE BACTERIOLÓGICA E HISTOLÓGICA

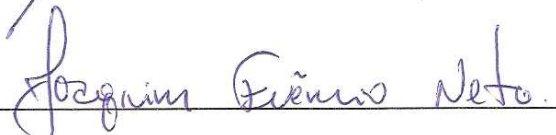
Tese aprovada em 22 de Fevereiro de 2011


Profa. Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro, UFPE


Profa. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford, UFPE


Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes, UFPE


Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho, UFPE


Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto, UFRPE

Recife, 2011

DEDICATÓRIA



A Deus,
pela presença constante em minha vida,
por todas as graças recebidas,
pela orientação nas minhas escolhas,
por encontrar sabedoria nos momentos difíceis,
e por permitir o convívio com pessoas maravilhosas.

Aos meus pais, **Fred e Gemma**,
tudo começou com o amor de vocês,
sem medir esforços e sacrifícios
para com minha vida e meus estudos,
optando por manter uma vida simples,
mas regada de muito trabalho e honestidade.
Não tenho palavras para agradecer o que fizeram e fazem por mim.

Aos meus irmãos, **Gemma e Felipe**,
pelo apoio e entusiasmo durante
a minha realização profissional.

Aos meus sogros, **Horácio e Denise**,
pelo amor, carinho, compreensão, incentivo e sobretudo,
pelas orações que me amparavam nos momentos de angústias.

Ao meu marido, **Diógenes**,
pelo amor e por compartilhar este momento comigo,
tendo por muitas vezes que respeitar minha ausência
durante as diversas fases de realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS



Agradecimentos

A minha querida orientadora, **Profa. Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro**, pelo amor, carinho, amizade, incentivo e confiança em minha pessoa, propondo-me desafios que por muitas vezes, nem eu imaginava conseguir superá-los. Para mim, a senhora é um exemplo de pesquisadora e orientadora, pois realmente participa e colabora com todas as etapas de um estudo, indo desde o planejamento, execução da metodologia, interpretação dos resultados e confecção de artigos. Sinto-me honrada por ter me dado oportunidade de trabalhar no seu laboratório e de ter sido sua orientanda. Muito obrigada por tudo, jamais me esquecerei da senhora.

A minha co-orientadora, **Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio**, que com toda sua paciência, transmitiu-me de forma carinhosa seus conhecimentos histológicos, os quais foram imprescindíveis para realização desta pesquisa.

Ao **Dr. Edeones Tenório de França** e **Sr. José Paulino Ventura** pelos animais, conhecimentos transmitidos e espaços cedidos junto ao Biotério do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

Ao **Prof. Dr. Luciano Tavares Montenegro** e ao **Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho**, pela confiança depositada em minha pessoa, abrindo não só as portas do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, mas também as dos seus próprios laboratórios, inclusive autorizando-me a trabalhar aos sábados, domingos e feriados, o que possibilitou a conclusão desta pesquisa em tempo hábil.

Ao **Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto**, por ter cedido gentilmente seu laboratório para a realização dos registros histológicos obtidos neste estudo; e a sua estagiária **Maria Edna Gomes de Barros**, pela atenção, orientação, dedicação e paciência durante os mesmos.

A querida **Maria de Fátima Alves Diniz** pelo carinho, amizade, dedicação e presteza durante os ensinamentos e realização das diversas etapas microbiológicas desenvolvidas neste trabalho.

A **Gustavo Andrey Lins Falcão de Alcântara** pelo empenho e paciência durante as fases do processamento histológico e pela amizade adquirida ao longo deste estudo.

Ao **Dr. Chefas Silva Guedes** pela amizade, atenção e dedicação durante as etapas laboratoriais desempenhadas neste experimento.

Ao **Sr. Moisés José Oliveira de Melo** pela sua cordialidade e disponibilidade em todos os momentos que precisei de sua ajuda.

Aos amigos, ex-estagiários, **Judith Advíncula Rocha** e **Bruno Sampaio**, pela valiosa colaboração, responsabilidade e companheirismo. Estes foram fundamentais para a execução desta pesquisa.

Agradeço a todos que compõem o Laboratório de Microbiologia Clínica do LIKA/UFPE. Em especial aqueles que estiveram mais próximos a mim: **Maiara Santos Severo**, **Juliana Félix de Melo**, **Alice de Andrade Bezerra**, **Thacianna Barreto da Costa**, **Natália Gomes de Moraes** e **Thays Miranda de Almeida**, cada uma com seu modo de ser, possuindo habilidades diferentes e participando de situações peculiares sabe exatamente a grande importância que teve para mim.

A coordenação e aos professores da Pós-Graduação em Nutrição, pelos ensinamentos transmitidos durante as disciplinas oferecidas por este curso, aprimorando assim, nossa formação profissional.

A querida **Neci Maria Santos do Nascimento** e demais secretárias da Pós-Graduação em Nutrição, pela amizade, atenção e compromisso demonstrados no decorrer deste curso.

Enfim, agradeço sinceramente, de todo meu coração, aos meus familiares e amigos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

ΕΠÍΓΡΑΦΕ



“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem.
Por isso, existem momentos inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

“Qualquer um que pára de aprender é velho:
quer isto aconteça aos vinte ou aos oitenta anos.
E qualquer um que continua a aprender
não só permanece jovem, mas se torna cada vez mais valioso.”

Henry Ford

RESUMO



RESUMO

A desnutrição neonatal, mesmo após um período de recuperação nutricional, é capaz de comprometer os mecanismos de defesa no organismo adulto. Isto se deve ao fato de que o período neonatal corresponde a uma fase de grande vulnerabilidade, em decorrência da formação dos diversos sistemas orgânicos. Assim sendo, o objetivo dessa pesquisa foi estudar o processo de alveolite dentária em seus aspectos bacteriológicos e histológicos relacionando-os com o desenvolvimento de bacteremia em ratos adultos desnutridos no período neonatal. Foram utilizados 40 ratos, machos, Wistar, amamentados por mães que receberam dieta durante a lactação contendo 17% de caseína, grupo nutrido (N) ou 8% de caseína, grupo desnutrido (DN). Após o desmame, os animais foram recuperados com dieta padrão, Labina® contendo 23% de proteínas mistas até o final do experimento. Depois de 90 dias, estes animais foram submetidos à extração do incisivo superior direito e indução da alveolite, os quais permitiram obter os seguintes resultados: antes e depois da extração evidenciou-se menor crescimento bacteriano dado por unidade formadora de colônia (UFC) na região peri-alveolar de incisivos superiores direito dos animais desnutridos, tal fato ocorreu de forma inversa após a alveolite, onde se constatou uma maior quantidade de UFC nestes animais. O percentual de hemoculturas positivas obtido após a alveolite foi maior nos animais desnutridos. Com relação à osteocalcina, houve redução da mesma no grupo N-28 e aumento no grupo DN-28; a disponibilidade do cálcio iônico foi maior nos animais nutridos e o processo de cicatrização alveolar apresentou também um maior desenvolvimento nestes animais. Pode-se assim concluir que, a desnutrição neonatal foi capaz de provocar uma diminuição na resposta imunológica dos animais, promovendo alterações perceptíveis em suas defesas contra os agentes infecciosos ainda no organismo adulto. Estas alterações foram evidenciadas na composição da microbiota pertencente à região peri-alveolar e no desenvolvimento de bacteremia, comprovando através deste, a existência de uma relação direta entre doenças bucais e sistêmicas. Outrossim, foi observado retardo no processo de cicatrização alveolar com modificações nos níveis de osteocalcina e do cálcio iônico.

Palavras-chave: Desnutrição, bacteremia, alveolite dentária, microbiota peri-alveolar, cicatrização alveolar.

ABSTRACT



ABSTRACT

Neonatal malnutrition, even after a period of nutritional recovery, can impair the defense mechanisms in the adult organism. This is due to the fact that the neonatal period represents a stage of great vulnerability, due to the formation of various organic systems. The aim of this research was therefore to study the process of dental alveolitis in its bacteriological and histological aspects, relating them to the development of bacteremia in undernourished adult rats in the neonatal period. We used 40 Wistar male rats, suckled by their mothers, fed a diet during lactation containing 17% casein in the nourished group (N) or 8% casein in the undernourished group (UN). After weaning, the animals were given the Labina standard diet, containing 23 % mixed protein until the end of the experiment. After 90 days, the animals underwent upper right incisor extraction and induction of alveolitis, which yielded the following results: before and after extraction a lower bacterial growth was observed per colony forming unit (CFU) in the peri-alveolar region of the upper right incisors of undernourished animals, while the opposite was true after alveolitis, when a larger number of CFU was seen in these animals. The percentage of positive blood cultures obtained after the alveolitis was higher in the undernourished animals. Regarding to osteocalcin, a reduction was observed in group N-28 and an increase in group DN-28; the availability of ionized calcium was higher in the nourished animals and the alveolar healing process was also more development in these animals. In conclusion, neonatal malnutrition was able to cause a decrease in the immune response of the animals, promoting noticeable changes in their defenses against infectious agents, even in the adult organism. These changes were seen in the composition of the microbiota from the peri-alveolar region and in the development of bacteremia, thereby demonstrating the existence of a direct relationship between oral and systemic diseases. Moreover, there was a delay in the alveolar healing process with changes in the levels of osteocalcin and ionized calcium.

Keywords: Malnutrition, bacteremia, dental alveolitis, peri-alveolar microbiota, alveolar healing.

SUMÁRIO



SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	20
	HIPÓTESES	22
	OBJETIVOS	23
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	ALVEOLITE DENTÁRIA	25
2.2	DESNUTRIÇÃO	26
2.3	MICROBIOTA ORAL	27
2.4	BACTEREMIA...	28
2.5	OSTEOCALCINA E CÁLCIO IÔNICO	29
2.6	REPARAÇÃO ALVEOLAR	31
3	MÉTODOS	34
3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	34
3.2	ANIMAIS	34
3.2.1	Manipulação nutricional	34
3.2.2	Crescimento somático	35
3.2.3	Indução do processo de alveolite	35
3.3	ANÁLISE BACTERIOLÓGICA	38
3.4	HEMOCULTURA	41
3.5	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE OSTEOCALCINA E CÁLCIO IÔNICO	42
3.6	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	45
3.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA	46
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
4	RESULTADOS	49
4.1	PRIMEIRO ARTIGO ORIGINAL	50
4.2	SEGUNDO ARTIGO ORIGINAL	74
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
	REFERÊNCIAS	112
	APÊNDICE A – Artigo Publicado	127
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	131
	ANEXO B – Submissão do Primeiro Artigo Original	133
	ANEXO C – Submissão do Segundo Artigo Original	136

ANEXO D – Revisora da Revista Homeopathy	139
ANEXO E – Trabalhos em Congresso	142
ANEXO F – Co-orientação de Monografia	158

APRESENTAÇÃO



1 APRESENTAÇÃO

A presente tese intitulada “Desnutrição neonatal e bacteremia em processo de alveolite dentária em ratos: análise bacteriológica e histológica” teve como objetivo estudar o processo de alveolite dentária em seus aspectos bacteriológicos e histológicos relacionando-os com o desenvolvimento de bacteremia em ratos adultos desnutridos no período de lactação.

A fim de abordar aspectos importantes relacionados ao tema desta pesquisa, a revisão bibliográfica foi organizada em capítulos separados que incluíram: a Alveolite Dentária, na qual se abordou aspectos sobre sua etiologia; a Desnutrição, considerando sua influência sobre o organismo; a Microbiota Oral, apontando seus benefícios e algumas situações que podem provocar seu desequilíbrio; a Bacteremia, enfatizando a possibilidade de existir uma relação direta entre doenças bucais e sistêmicas; a Osteocalcina e o Cálcio Iônico, mostrando suas utilizações no estudo do metabolismo ósseo e da Reparação Alveolar, apresentando suas fases e demonstrando que este processo é capaz de sofrer alterações diante de alguns fatores, como a alveolite e a desnutrição.

Para testar as hipóteses desta tese, foi necessário utilizar alguns recursos metodológicos específicos, como: a desnutrição neonatal foi desenvolvida através da dieta com caseína a 8%, esta consiste numa dieta experimental padrão, capaz de induzir desnutrição, sendo preconizada internacionalmente; a microbiota peri-alveolar foi coletada com “swab” estéril e descartável, o que permitiu a partir de seu semeio contar as unidades formadoras de colônias (UFC) e identificar as bactérias existentes; a bacteremia foi comprovada pela presença de bactérias nos hemocultivos provenientes do sangue venoso da cauda de cada animal; os níveis de osteocalcina e cálcio iônico foram determinados pelos métodos de quimioluminescência e calculado, respectivamente; e o estágio da cicatrização alveolar foi averiguado através do sistema de análise de imagem constituído por microscópio óptico acoplado com microcâmera Motic® e microcomputador contendo o programa Motic Image Plus®.

Ainda no início da execução da metodologia, houve dificuldade em encontrar relatos na literatura quanto à descrição da microbiota normal correspondente à região peri-alveolar de incisivos de ratos. Deste modo, foi de grande importância à realização de um estudo paralelo, cuja finalidade era identificar esta microbiota. Este estudo, portanto, possibilitou a publicação de um artigo intitulado “**Normal microbiota of the perialveolar region of incisors of rats**”,

na revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, classificada pela CAPES como qualis B2 para área de medicina II (APÊNDICE A).

Os resultados do presente estudo foram apresentados na forma de dois artigos originais enviados para revistas internacionais indexadas. O primeiro artigo **“Peri-alveolar bacterial microbiota and bacteremia after dental alveolitis in adult rats submitted to neonatal malnutrition”** teve como objetivo analisar os aspectos bacteriológicos durante processo de alveolite dentária, relacionando-o com maior ocorrência de bacteremia em ratos adultos desnutridos. Este artigo foi submetido como artigo original ao British Journal of Nutrition, que é classificado pela CAPES como qualis A2 para área de medicina II. O segundo artigo **“Dental alveolitis and alveolar healing in rats submitted to neonatal malnutrition”** teve como objetivo relacionar as dosagens de osteocalcina e cálcio iônico com o processo de cicatrização alveolar em ratos desnutridos e portadores de alveolite dentária. Este artigo foi submetido como artigo original a Research in Veterinary Science, que é classificada pela CAPES como qualis B1 para área de medicina II.

Assim sendo, os resultados encontrados nesta pesquisa sugeriram que, a desnutrição neonatal, mesmo após um período de recuperação nutricional, foi capaz de comprometer os mecanismos de defesa no organismo adulto. Isto se deve ao fato de que o período neonatal corresponde a uma fase de grande vulnerabilidade, em decorrência da formação dos diversos sistemas orgânicos. Portanto, espera-se que esta tese através da utilização do rato como modelo experimental, possa ter contribuído de forma positiva para outros pesquisadores e profissionais de saúde, demonstrando a importância de se ter o conhecimento do estado nutricional do paciente, tanto no período neonatal quanto no atual, pois um ou outro quando comprometido, pode provocar diminuição de sua resposta imunológica, principalmente, diante de processos infecciosos.

HIPÓTESES

Os ratos desnutridos terão um padrão bacteriano da região peri-alveolar e do sangue periférico diferente, tanto em quantidade quanto em qualidade, quando comparado ao padrão dos ratos nutridos. Assim sendo, após a alveolite, com relação aos aspectos quantitativos os ratos desnutridos deverão apresentar um maior número de bactérias e quanto aos qualitativos, as bactérias deverão ter em sua maioria potencial patogênico.

A osteocalcina terá sua concentração elevada diante do processo de reparação óssea e normalizada após o mesmo. No entanto, nos animais desnutridos seus níveis permanecerão elevados devido à tentativa de recuperação da atividade osteogênica. Quanto ao cálcio iônico, existirão menores concentrações do mesmo nos desnutridos, devido às carências nutricionais sofridas por estes animais no período neonatal.

No que diz respeito aos aspectos histológicos, haverá maior retardo na cicatrização alveolar dos ratos desnutridos, decorrente de possíveis sequelas originadas após desnutrição sofrida no período de lactação.

OBJETIVOS

Geral

Estudar o processo de alveolite dentária em seus aspectos bacteriológicos e histológicos relacionando-os com o desenvolvimento de bacteremia em ratos adultos desnutridos no período neonatal.

Específicos

Em ratos nutridos e desnutridos, submetidos ao processo de alveolite, foram cumpridos os seguintes objetivos:

- Avaliar o crescimento somático;
- Verificar o número de UFC da região peri-alveolar de incisivos superiores direito de ratos;
- Determinar a microbiota da região peri-alveolar de incisivos superiores direito de ratos;
- Comparar as espécies de bactérias encontradas na região peri-alveolar de incisivos superiores direito de ratos;
- Determinar a ocorrência de bacteremia;
- Comparar as espécies de bactérias presentes no sangue periférico após o hemocultivo;
- Quantificar os níveis de osteocalcina e cálcio iônico;
- Estudar os aspectos histológicos da reparação óssea alveolar de incisivos superiores direito de ratos.

REVISÃO DA LITERATURA



2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ALVEOLITE DENTÁRIA

Apesar dos avanços técnico-científicos desenvolvidos na área de Odontologia, sobretudo no que diz respeito aos procedimentos odontológicos propriamente ditos, nos quais é possível lançarmos mão de medidas terapêuticas preventivas e curativas que nos permitam manter o elemento dentário na cavidade bucal, podemos constatar que ainda é bastante comum nos depararmos com situações em que a extração dentária corresponde à opção de tratamento mais coerente.

É importante ressaltar que esta conduta não conservadora atinge freqüentemente a população mais carente e desnutrida visto que condições sócio-econômicas não permitem a estes indivíduos ingestão adequada de alimentos (SHAHAR et al., 2005), práticas de higiene bucal, nem tampouco a utilização de recursos terapêuticos que impeçam a perda de seus elementos dentários, pois na maioria das vezes, eles são atendidos em serviços públicos, que não oferecem recursos suficientes para a realização de técnicas operatórias atraumáticas e que obedeçam aos princípios de uma cadeia asséptica (HOFFMANN, 1995; ADEYEMO, 2004). Desta forma, estes pacientes apresentam freqüentemente pós-operatórios muito doloridos, podendo até mesmo desenvolver uma afecção severa conhecida como alveolite (PAPA, 2000; NUSAIR; YOUNIS, 2007; RESENDE, 2009).

Assim sendo, após a extração de um dente, forma-se primeiramente um coágulo sangüíneo no local e sua organização final é feita por uma reação de granulação, a qual é substituída gradualmente por um osso fibrilar grosseiro e, finalmente, por osso maduro. No entanto, a não formação desse coágulo inicial ou a sua necrose ou ainda o seu desprendimento das paredes alveolares impede a cicatrização de forma apropriada, podendo causar uma afecção denominada de alveolite, alveolite pós-operatória, alveolite fibrinolítica, alvéolo seco, osteíte alveolar ou osteomielite localizada (AGUILAR; AHEDO; SPIRO, 2005; TORRES-LAGARES et al., 2005; TORRES-LAGARES et al., 2006; KREUGER et al., 2007; BORTOLUZZI et al., 2008). Os sinais e sintomas mais comumente observados nesta doença são: dor acentuada e pulsátil, odor fétido e persistente, osso alveolar exposto, ausência de cicatrização tecidual, secreção purulenta, tumefação, linfadenopatia e hiperemia

(ARTEAGOITIA-CALVO et al., 2002; MELO JÚNIOR et al., 2002; CASO; HUNG; BEIRNE, 2005; RICIERI et al., 2006; NUSAIR; YOUNIS, 2007; RESENDE, 2009).

2.2 DESNUTRIÇÃO

De acordo com Brown; Pollitt (1996) e Fioretto et al. (2002), a desnutrição ocorrida nos primeiros anos de vida pode originar consequências severas no organismo adulto. Em humanos, eventos importantes para a imunocompetência são iniciados ainda no embrião e continuam na primeira semana de vida; em ratos, a competência imunológica é adquirida gradualmente após o nascimento (GOBEL, 1996), pois os mecanismos fundamentais da resposta imune estão completamente desenvolvidos apenas no primeiro mês de vida destes animais, e neste período, as agressões nutricionais poderão ocasionar um comprometimento do sistema imunológico, com sequelas na capacidade de defesa do indivíduo adulto (FERREIRA E SILVA, 2008).

Durante fases críticas do desenvolvimento, exposição a estímulos ambientais nocivos pode desencadear um processo chamado de programação. Nesse processo, esses fatores ditos epigenéticos podem ocasionar modificações no padrão genético levando a alterações permanentes na fisiologia e no metabolismo dos diferentes sistemas orgânicos (LANGLEY-EVANS, 2009). Em ratos, uma destas fases críticas constitui o período de lactação ou aleitamento, o qual corresponde às primeiras três semanas de vida pós-natal, sendo uma fase em que os sistemas orgânicos do animal encontram-se altamente vulneráveis a estímulos hostis (ROCHA-DE-MELO et al., 2006).

Segundo Monteiro (1995, 2003), a desnutrição nas suas diferentes formas assume grandes proporções no Brasil e está presente em todas as suas regiões e áreas, apesar de que a população mais afetada reside nas regiões Norte e Nordeste. Este mesmo autor defende ainda que os indivíduos desnutridos manifestam sinais clínicos provenientes da inadequação quantitativa (energia) ou qualitativa (nutrientes) da dieta ou decorrentes de doenças que determinam o mau aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos.

Energia e proteína são elementos fundamentais para que o processo de cicatrização se desenvolva da melhor forma possível, independente dele ser decorrente de um trauma, fratura ou pós-operatório (HOFFMANN, 1995; GUARNIERO et al., 1996; NEUMANN et al., 2004).

Guarniero et al. (2003), Silva; Teixeira; Goldberg (2004) e Aguilar-Nascimento (2010) afirmaram que a neoformação óssea consiste de uma série complexa de eventos celulares, os quais necessitam de alta taxa de síntese protéica, daí a importância de se manter o estado nutricional eutrófico e a dieta com níveis adequados de proteínas.

Com relação à desnutrição, Chandra (1997, 2002) apontou-a como uma das principais causas de deficiência secundária na resposta do organismo aos agentes infecciosos, favorecendo até mesmo, a evolução de uma infecção localizada em sistêmica. Isto ocorre devido às alterações na disponibilidade de componentes do sistema complemento e na função fagocítica, afetando diretamente a eliminação de patógenos.

Severino Martínez et al. (1997), Pena; Bacallao (2002), Neumann et al. (2004) e Ohyanagi (2004) defenderam que o risco de complicações pós-operatórias cresce consideravelmente em pacientes imunocomprometidos ou desnutridos, devido à diminuição da resistência dos mesmos, ou seja, maior vulnerabilidade às doenças; atraso no processo de cicatrização e altas taxas de infecções. Estas, por sua vez, podem conduzir o paciente a um quadro de septicemia, cujo risco de mortalidade é elevado (YEH, 2004; GRIFFITHS, 2004).

2.3 MICROBIOTA ORAL

Poi; Carvalho; Andrade (1999), Häkkinen; Uitto; Larjava (2000), Rosan; Lamont (2000), Paster et al. (2001), Santos et al. (2002), Martínez et al. (2004), Takarada et al. (2004), Walker; Karpinia; Baehni (2004) e Dufour; Svoboda (2005) relataram que a cavidade oral apresenta uma das mais concentradas e variadas populações microbianas, sendo habitada por mais de 500 espécies de bactérias. Araújo et al. (2007) encontraram na região peri-alveolar de ratos as seguintes bactérias: *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus coagulase negativa*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia liquefaciens*.

A maioria destes micro-organismos pode ser encontrada na cavidade oral de indivíduos saudáveis constituindo a microbiota endógena, a qual é também denominada de microbiota normal (RODRIGUE; LAVOIE, 1996). Esta pode beneficiar o hospedeiro através do desenvolvimento do sistema imune (MARCOTTE; LAVOIE, 1998) ou do antagonismo microbiano, isto é, prevenindo o crescimento excessivo de micro-organismos nocivos

(PASTER et al., 2001; YE et al., 2003). Apenas diante de alterações em determinados fatores é que ocorre um desequilíbrio entre esta microbiota e o hospedeiro, o qual favorece a instalação de processos inflamatórios e ou infecciosos (SWARTZ; GIBBONS; SOCRANSKY, 1996; TORTORA; FUNKE; CASE, 2000; YE et al., 2003). Nestes casos, os micro-organismos pertencentes à microbiota normal passam a ser denominados de patógenos oportunistas (PELCZAR JÚNIOR; CHAN; KRIEG, 1996).

Desta forma, Souza; Scarcelli (2000) perceberam que muitos micro-organismos ordinariamente considerados como não patogênicos, têm a capacidade de produzir infecção e doença. Esta propriedade não depende somente dos seus fatores de virulência, mas também, dos mecanismos de defesa do hospedeiro, os quais podem se encontrar enfraquecidos diante de determinadas situações, tais como: carências nutricionais, drogas imunossupressoras, síndrome da imunodeficiência humana, diabetes mellitus, câncer, infecções, dentre outros.

Totti et al. (1996), Yao; Lamont; Leu (1996), Santos; Jorge (1999), Chow (2000) e Darby; Curtis (2001) afirmaram que os micro-organismos endógenos da cavidade oral são capazes de provocar alterações nessa região, permitindo sua colonização por outras espécies. Entretanto, estes mesmos autores ressaltaram que além das modificações provocadas por estes micro-organismos, existem outros fatores como, por exemplo, a dieta e os processos infecciosos que também contribuem para mudanças na composição da microbiota.

2.4 BACTEREMIA

Segundo Papa (2000), Rocha Barros et al. (2000) e Siviero et al. (2009), as afecções bucais geralmente apresentam um comportamento autolimitante, ou seja, procedimentos clínicos como sondagem periodontal, extração dentária ou mesmo uma rigorosa escovação, podem ocasionar a introdução e disseminação de bactérias pertencentes à flora da cavidade bucal na corrente circulatória desencadeando uma bacteremia transitória. Esta, num organismo normal, é assintomática, de curta duração (eliminada em poucos minutos pelo sistema reticuloendotelial do hospedeiro) e sem significado clínico importante, pois o inóculo é pequeno e a virulência dos micro-organismos envolvidos é baixa. Entretanto, Yáñez (1996), Joshipura; Ritchie; Douglass (2000), Ngapeth-Etoundi et al. (2001), Bhatawadekar; Bhardwaj (2002), Costa et al. (2002) e Knouse; Madeira; Celani (2002) evidenciaram em alguns casos

uma associação entre doenças dentais e sistêmicas, incluindo bacteremia, doenças respiratórias, aneurismas micóticos e endocardite bacteriana.

Com relação à bacteremia, Salles et al. (1999) definiram-na como sendo a presença de bactérias viáveis no sangue. Bhatawadekar; Bhardwaj (2002) ressaltaram que esta permite a instalação de bactérias em diferentes locais do organismo. Segundo Baitello et al. (2004), tal fato quando associado à liberação de vários mediadores humorais pode desencadear a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica. No entanto, Lam et al. (2008) e Lockhart et al. (2008) enfatizaram que vários fatores são determinantes na importância clínica da bacteremia, como: local da infecção, gravidade da doença primária, tipo de patógeno envolvido e imunidade do paciente. Segundo Bruno (2007) e Tsolka; Katritsis (2009), as extrações dentárias correspondem aos procedimentos odontológicos mais prováveis de causar a bacteremia.

No que diz respeito à endocardite bacteriana, Furtado; Simone (2000), Oliver; Roberts; Hooper (2007) e Souza et al. (2007) definiram-na como sendo uma endocardite infecciosa causada por bactérias presentes na cavidade oral, as quais são conduzidas à corrente circulatória e se instalam freqüentemente sobre válvulas cardíacas ou endocárdio previamente danificado ou congenitamente malformado. Silva et al. (2007) enfatizaram que os sintomas da endocardite, na maioria das vezes, iniciam-se duas semanas após a instalação destas bactérias.

2.5 OSTEOPOROSE E CÁLCIO IÔNICO

Delmas (1993) e Watts (1999) relataram que houve um avanço no desenvolvimento de técnicas não invasivas para avaliar a formação da matriz óssea, pois estas permitem medir seus componentes, à medida que os mesmos alcançam a circulação durante a formação do tecido ósseo. Vieira (1999) explicou que o tecido ósseo apresenta uma série de características muito peculiares, dentre elas a presença de cristais radiopacos. Estes últimos propiciam o exame do esqueleto de uma maneira muito simples, através do emprego de técnicas de absorção de raio-X, quer qualitativas (raio-X simples), quer quantitativas (densitometria óssea ou tomografia quantitativa). No entanto, os fenômenos metabólicos, fisiológicos ou patológicos, que podem atingir o tecido ósseo só afetam significativamente sua estrutura radiopaca após um lapso de tempo considerável. Isto torna o emprego destas técnicas limitado

para o estudo mais dinâmico, e a curto prazo, do metabolismo ósseo. Em vista disso, Delmas (1992) e Guarniero et al. (2003) preconizaram a quantificação da osteocalcina como um dos bons parâmetros para avaliar a reparação do tecido ósseo, já que esta consiste num marcador bioquímico específico de neoformação óssea.

Vargas; Audí; Carrascosa (1997), Coleman (2002), Allen (2003) e Vieira (2007) definiram marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo como substâncias que retratam a formação ou a reabsorção óssea em tempo real. Como a formação depende da ação dos osteoblastos, os marcadores desta medem na realidade produtos decorrentes da ação dos mesmos. De modo semelhante, têm-se os marcadores de reabsorção que medem a ação do principal tipo celular envolvido nesta função, ou seja, os osteoclastos. De acordo com Delaurier et al. (2004) e Cardoso et al. (2007), estes marcadores podem ser mensurados por testes do tipo radioimunométrico (IRMA), radioimunoensaio (RIA), ELISA, quimioluminescência, eletroforese ou cromatografia líquida de alta performance.

Dentre os marcadores de formação óssea encontram-se a osteocalcina, a fosfatase alcalina total, a fosfatase alcalina óssea, o peptídeo carboxiterminal do procolágeno tipo I e o peptídeo aminoterminal do procolágeno tipo I (DELMAS, 2001; SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002; ANDRIOLO, 2007).

Rico; Revilla; Cabrera (1993), Castillo et al. (1999), Saraiva; Lazaretti-Castro (2002) e Cardoso et al. (2007) defenderam através de seus estudos que um dos principais marcadores de formação óssea no soro é a osteocalcina. Esta consiste numa proteína composta por 49 aminoácidos, sendo três (posições 17, 21 e 24) constituídos por ácido gama-carboxiglutâmico (Gla), o que lhe dá a peculiaridade de se ligar ao cálcio. Castillo et al. (1999) ressaltaram ainda que a osteocalcina é uma proteína produzida unicamente por osteoblastos durante o processo osteogênico, formando parte da matriz óssea (colágeno ósseo).

O cálcio é um mineral importante para várias atividades metabólicas, dentre as quais se destaca o metabolismo ósseo. Sua presença permite que haja formação e manutenção da densidade mineral óssea (PAIXÃO; BRESSAN, 2010).

Andriolo et al. (2004), Barber (2004), Dickerson et al. (2004) e Inzucchi (2004) relataram que o cálcio sérico total presente no organismo é a somatória do cálcio ligado às proteínas plasmáticas (40%), principalmente à albumina; do cálcio quelado (10%), ou seja, formando compostos com o citrato, fosfato ou sulfato; e do cálcio ionizado (50%), isto é, a parcela livre do cálcio. Esta última corresponde à porção biologicamente ativa do cálcio.

Feldman (2004) e Byrnes et al. (2005) afirmaram que o cálcio pode estar ligado às proteínas plasmáticas. Neste caso, diante de uma hipoalbuminemia, a concentração total do

cálcio diminui, mas a concentração do cálcio ionizado não sofre alteração. Desse modo, para Vieira (2007), Calvi; Bushinsky (2008) e Costa et al. (2008), ficou evidente um maior poder diagnóstico diante da possibilidade de determinação do cálcio ionizado, o qual deve ser preferido sempre que estiver disponível.

2.6 REPARAÇÃO ALVEOLAR

Embora fundamentalmente comparável a outros tecidos ósseos do corpo, o osso alveolar apresenta habilidade de sofrer uma remodelação rápida e contínua associada à presença ou ausência de dentes. Esta remodelação óssea envolve a coordenação de atividades celulares de duas linhagens distintas, os osteoblastos e os osteoclastos, que formam e reabsorvem tecidos mineralizados do osso, respectivamente (KATCHBURIAN; ARANA, 1999; SODEK; McKEE, 2000; CARVALHO; LUPPINO; MENDES, 2002; LANDIM; JUNQUEIRA; ROCHA, 2002; BREW; FIGUEIREDO, 2003; BECHELLI, 2006).

Marzola (1994) afirmou que em condições normais, a cicatrização alveolar em humanos leva aproximadamente 64 dias para se concretizar. Cardaropoli, Araújo e Lindhe (2003) comprovaram que esse tempo em cães diminui para 48 dias. Dib; Santos Júnior; Carvalho (1994), Poi et al. (1998), Boeck et al. (1999), Brandão et al. (2002) e Elsubeihi; Heersche (2004) concluíram que em ratos, esse período decresce para 21 dias.

Estudos demonstraram que o processo de cicatrização alveolar, independente da espécie de animal, obedece à mesma seqüência de eventos: primeiramente, o coágulo sangüíneo que preenche o alvéolo após a extração dentária é progressivamente reabsorvido, à medida que as células endoteliais e fibroblastos originados de restos do ligamento periodontal proliferam e migram para seu interior, originando uma reação de granulação. A seguir, os fibroblastos originam osteoblastos que sintetizam a matriz óssea, formando um trabeculado ósseo imaturo (osteóide) que é gradativamente mineralizado pela deposição de cálcio (NICOLLI FILHO et al., 1993; OKAMOTO et al., 1993; MAGRO FILHO et al., 1996; LISBOA NETO et al., 1998; AUKHIL, 2000; CALIXTO et al., 2001; YUGOSHI et al., 2002; BALDUCCI-ROSLINDO; MATA; MALAGOLI, 2003; KANYAMA et al., 2003; MAGRO ÉRNICA; MAGRO FILHO; RANGEL GARCIA, 2003; ARAÚJO; LINDHE, 2005).

Lin; McCulloch; Cho (1994) e Polimeni; Albandar; Wikesjö (2004) enfatizaram a importância do ligamento periodontal no processo de cicatrização do osso alveolar, visto que

os fibroblastos provenientes deste ligamento proliferam-se ativamente após uma extração dentária, migrando para dentro do coágulo, formando tecido conjuntivo denso e em seguida, diferenciando-se em osteoblastos, para formar novo osso.

Segundo Devlin et al. (1997) e Calixto et al. (2001), durante a cicatrização óssea alveolar, as fibras de Sharpey migram do osso periférico para o centro do alvéolo. Este fato justifica a aposição das trabéculas ósseas de forma concêntrica, ou seja, das paredes vestibular/palatina para o centro do alvéolo e do terço apical para o cervical.

Segundo Balducci-Roslindo; Silvério; Malagoli (1999), Carvalho; Luppino; Mendes (2002), Yücel et al. (2003), Pereira et al. (2006) e Silva et al. (2007), os mecanismos de cicatrização de ferida de extração dental estão relacionados com fatores de natureza endógena e exógena, sistêmica ou local, os quais podem induzir a aceleração ou o retardo deste processo.

Carvalho; Okamoto; Barbosa (1991), Poi et al. (2000) e Araújo (2006) demonstraram através de seus estudos que a alveolite retarda o processo de cicatrização alveolar, pois os alvéolos pertencentes ao grupo de ratos portadores dessa afecção (grupo controle), exibiram uma discreta neoformação óssea ao nível dos terços médio e apical. Adeyemo (2004) explicou que este atraso da cicatrização era provocado pelas células alveolares que se encontravam danificadas, devido à inflamação presente na medula óssea alveolar, durante o processo de alveolite.

Heaney (2000), Abrams; O'Brien (2004) e Aguilar; Ahedo; Spiro (2005) afirmaram que dentre os fatores que podem influenciar a cicatrização alveolar normal encontra-se o estado nutricional do paciente, pois segundo Carvalho et al. (2002) este interfere no comportamento das células ósseas, nos fatores reguladores envolvidos no crescimento e na manutenção da massa óssea. Junqueira; Carneiro (1999) relataram que a deposição de cálcio, a síntese de colágeno e a multiplicação das células osteogênicas vitais para a reparação óssea necessitam de grande volume de síntese protéica. Desta forma, Giacomelli; Natali (1999) e Waitzberg (2009) concluíram que o processo de cicatrização óssea torna-se mais lento diante das carências nutricionais, visto que neste período, as células encontram-se em maior atividade mitótica, necessitando com isso, de um maior aporte nutricional.

MÉTODOS



3 MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEa-UFPE), sob o processo nº 008283/2007 - 34 (ANEXO A).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 40 ratos, albinos, machos da linhagem Wistar, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos no biotério sob temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas (claro - 6 às 18h; escuro - 18 às 6h).

3.2.1 Manipulação nutricional

Após o nascimento, os filhotes machos foram mantidos com suas mães em número de seis, tal número favorece a manutenção do padrão nutricional (COMMITTEE ON LABORATORY ANIMAL DIETS, 1979). Deste modo, quando necessário, procedia-se à redução ou complementação da prole através da escolha aleatória de filhotes machos. Vale salientar que no caso da complementação, esta foi realizada utilizando-se outras ninhadas da mesma idade. Em seguida, tomando-se por base o regime dietético empregado, obtiveram-se os seguintes grupos com 20 animais cada:

Nutrido (N): constituído por filhotes, cujas mães receberam dieta do tipo caseína a 17% durante o período de aleitamento.

Desnutrido (DN): formado por ratos aleitados, cujas mães foram submetidas à dieta nutricionalmente deficiente com 8% de caseína durante o período de lactação.

A diferença de tamanho existente entre os animais nutridos e desnutridos foi facilmente visualizada no 15º dia de vida (Figura 1).

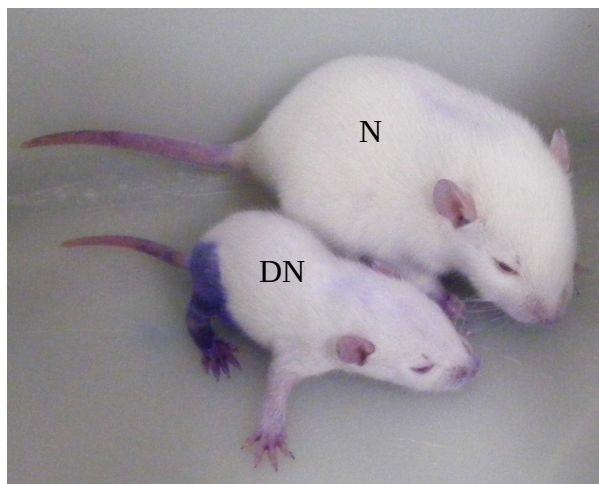


Figura 1 – Diferença entre o animal nutrido (N) e o desnutrido (DN), decorridos 15 dias de seu nascimento.

É importante ressaltar que após o desmame as mães foram eutanasiadas.

3.2.2 Crescimento somático

Os animais nutridos e desnutridos foram amamentados até o 21^o dia após o nascimento - período de aleitamento (HARKNESS, 1993). Nesse período foram registrados diariamente (em balança eletrônica digital – Marte, modelo S-4000-com sensibilidade de 0,1g) os pesos corporais de cada animal, a fim de acompanhar sua evolução ponderal durante a manipulação nutricional. A partir do 22^o dia de vida, os animais foram separados de suas mães, mantidos em gaiolas coletivas, contendo 3 animais cada, sendo alimentados com água *ad libitum* e dieta padrão do biotério (Labina[®] – Purina do Brasil S/A), contendo 23% de proteínas mistas até o final do experimento, seus pesos corporais eram aferidos uma vez por semana, permitindo assim, acompanhar se houve ou não recuperação nutricional dos mesmos.

3.2.3 Indução do processo de alveolite

Após 90 dias todos os animais (nutridos e desnutridos, em um total de 40), foram submetidos ao processo de alveolite.

Para a execução desta etapa, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (10 mg/kg de peso) + cloridrato de xilazina (0,5 mg/kg de peso), associados na mesma seringa e administrados por via intramuscular (Figura 2). Em seguida, realizava-se a extração do incisivo superior direito, segundo a técnica preconizada por Okamoto; Russo

(1973), na qual se utiliza instrumentais semelhantes aqueles empregados nas exodontias de dentes decíduos em crianças, como: sindesmótomo e fórceps infantis (Figuras 3 e 4). Depois da extração, uma isquemia alveolar era provocada através da introdução de um pequeno chumaço de algodão estéril embebido em adrenalina 1:1000, durante 15 minutos; posteriormente a remoção deste algodão, os animais permaneciam em observação por mais 15 minutos, com objetivo de comprovar a ausência de formação do coágulo sanguíneo no interior do alvéolo (Figura 5) e após 48 horas, estes animais eram examinados clinicamente, através do afastamento de seus lábios, o que permitia constatar o desenvolvimento da alveolite mediante a presença de odor fétido, edema local, hiperemia, formação de abscesso e secreção purulenta (POI et al., 2000; ARAÚJO, 2006; ARAÚJO et al., 2009) (Figura 6).



Figura 2 – Aplicação de anestesia intramuscular contendo cloridrato de ketamina + cloridrato de xilazina.



Figura 3 – Extração do incisivo superior direito utilizando fórceps infantil.



Figura 4 – Incisivo superior direito de rato.

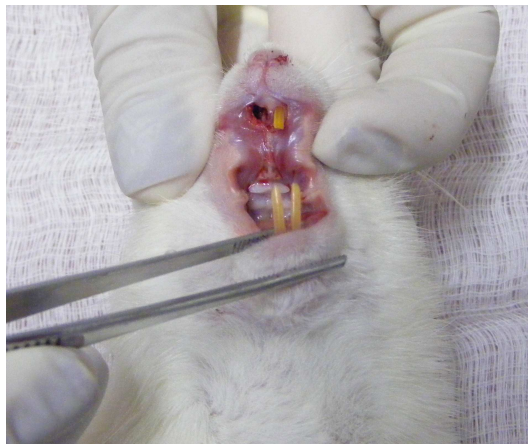


Figura 5 – Alvéolo de incisivo superior direito após isquemia, mostrando ausência de coágulo sanguíneo.

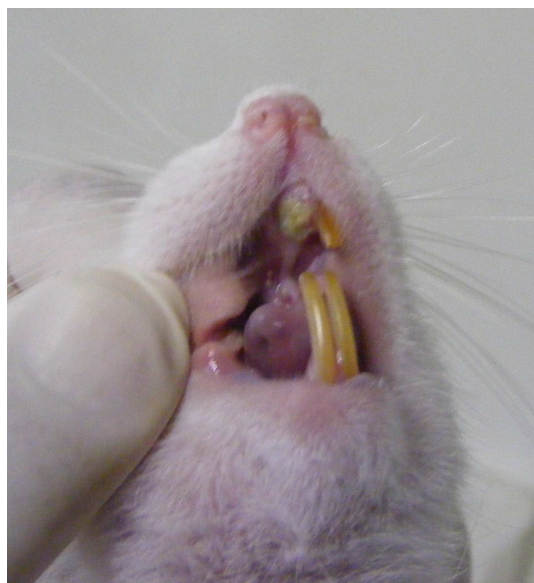


Figura 6 – Exame clínico para constatar o desenvolvimento da alveolite dentária.

Considerando os dados da literatura em que o processo de cicatrização alveolar normal em ratos se completa aproximadamente 21 dias após a extração (DIB; SANTOS JÚNIOR; CARVALHO, 1994; POI et al., 1998; BOECK et al., 1999; BRANDÃO et al., 2002; ELSUBEIHI; HEERSCHKE, 2004) e que a alveolite dentária é capaz de retardar este processo, já que aos 28 dias de pós-operatório os alvéolos portadores desta afecção apresentam discreta neoformação óssea (CARVALHO; OKAMOTO; BARBOSA, 1991; POI et al., 2000), os ratos nutridos e os desnutridos foram separados aleatoriamente nos seguintes grupos:

- a) Grupo N-21 – animais nutridos que sofreram eutanásia no 21^o dia após a comprovação clínica da alveolite;
- b) Grupo DN-21 – animais desnutridos que sofreram eutanásia no 21^o dia após a comprovação clínica da alveolite;
- c) Grupo N-28 – animais nutridos que sofreram eutanásia no 28^o dia após a comprovação clínica da alveolite;
- d) Grupo DN-28 – animais desnutridos que sofreram eutanásia no 28^o dia após a comprovação clínica da alveolite.

Cada um destes grupos foi formado por 10 animais, os quais eram mantidos individualmente em gaiolas de propileno com tampa de arame zincado, desde o momento da extração até o dia da eutanásia.

3.3 ANÁLISE BACTERIOLÓGICA

Para realização desta análise, os animais foram anestesiados conforme técnica descrita no item 3.2.3. A mesa operatória foi coberta com um campo cirúrgico esterilizado e o animal posicionado sobre a mesma em decúbito dorsal. Este posicionamento facilitou a abertura bucal e o afastamento de seus lábios, permitindo assim, a realização da coleta da microbiota oral correspondente à região peri-alveolar do incisivo superior direito, segundo a técnica preconizada por Araújo (2006) e Araújo et al. (2007) na qual se utiliza um “swab” embebido em 40µL de solução de NaCl 0,9% estéril (Figura 7). Em seguida, este “swab” era colocado num tubo estéril contendo 460µL de Brain Heart Infusion (BHI) (Figura 8). As amostras foram homogeneizadas e 100µL de cada uma delas foram retirados e transferidos para outro tubo estéril contendo 900µl de BHI. Estes 1000µL foram homogeneizados e com o auxílio de

uma alça calibrada de 1 μ L, semearam-se placas de Petri contendo Ágar-sangue (Figura 9) e Agar Eosina Azul de Metileno Levine ou Ágar-Levine (Figura 10) para isolamento das bactérias gram-positivas e gram-negativas. Estas placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. As UFC que cresceram foram enumeradas por um contador manual de colônias sob lupa e seus percentuais calculados. Para identificação das bactérias gram-negativas utilizou-se o Kit enterobactéria (Laborclin[®]) e para as gram-positivas empregou-se: Staphclin, Novobiocina, Optoquina, Ágar Bile Esculina e NaCl 6,5%. Além disso, lâminas foram confeccionadas a partir de esfregaços secos à temperatura ambiente. Estes foram fixados pelo calor através da chama do bico de Bunsen, com posterior coloração pelo método de Gram, o qual permitia identificar os arranjos e formas bacterianas.

Este procedimento foi realizado antes da extração do incisivo superior direito, 5 minutos após a extração, no 21^o dia após a comprovação clínica da alveolite para os grupos N-21 e DN-21 e no 28^o dia após a comprovação clínica da alveolite para os grupos N-28 e DN-28.



Figura 7 – Realização da coleta da microbiota peri-alveolar antes da extração do incisivo superior direito.

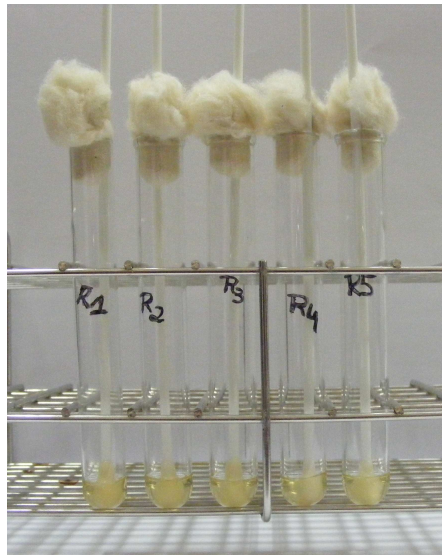


Figura 8 – “Swabs”, após coletas, em tubos estéreis contendo BHI.



Figura 9 – Semeio de placas de Petri contendo Ágar-sangue.



Figura 10 – Semeio de placas de Petri contendo Ágar-Levine.

3.4 HEMOCULTURA

Foram coletados 100 μ L de sangue venoso da cauda de cada animal para realizar os hemocultivos, antes da extração do incisivo superior direito, 5 minutos após a extração, no 21^o dia após a comprovação clínica da alveolite para os grupos N-21 e DN-21 e no 28^o dia após a comprovação clínica da alveolite para os grupos N-28 e DN-28 (Figura 11). O sangue era coletado em tubos contendo 900 μ L do meio de cultura BHI estéril e hermeticamente vedado (Figuras 12 e 13). Em seguida, os tubos eram colocados em estufa a 37 °C, durante 7 dias. Estas culturas foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar-sangue a cada 24, 48, 72, 120 e 168 horas. As hemoculturas foram consideradas positivas no primeiro destes intervalos em que se constatou presença de bactéria. Esta foi identificada conforme testes descritos no item 3.3. Foram consideradas hemoculturas negativas, aquelas que decorridos 7 dias de observação, não se evidenciou micro-organismo em nenhum dos semeios.



Figura 11 – Incisão na extremidade da cauda do rato para realizar os hemocultivos.



Figura 12 – Coleta do sangue venoso da cauda do rato para realizar os hemocultivos.



Figura 13 – Hemocultivos em fase de sedimentação.

3.5 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE OSTEOCALCINA E CÁLCIO IÔNICO

Para realização da quantificação destes níveis, coletaram-se 5mL de sangue de cada animal por punção cardíaca no 21^o dia após a comprovação clínica da alveolite para os grupos N-21 e DN-21 e no 28^o dia após a comprovação clínica da alveolite para os grupos N-28 e DN-28 (Figuras 14 e 15). O sangue coletado foi transferido para microtubos, os quais foram dispensados numa centrífuga Sigma Laboratory Centrifuges 6-15[®], refrigerada a 4°C, numa velocidade de 3000 rpm, durante 5 minutos (Figuras 16, 17 e 18). Em seguida, com o auxílio

de uma micropipeta de 100 μ L, os soros obtidos foram depositados em novos microtubos e armazenados em freezer a - 20°C até o momento de serem encaminhados aos Laboratórios CIAC/ÁLVARO para a realização das dosagens de osteocalcina, através do método de Quimioluminescência e de cálcio iônico, pelo método Calculado.

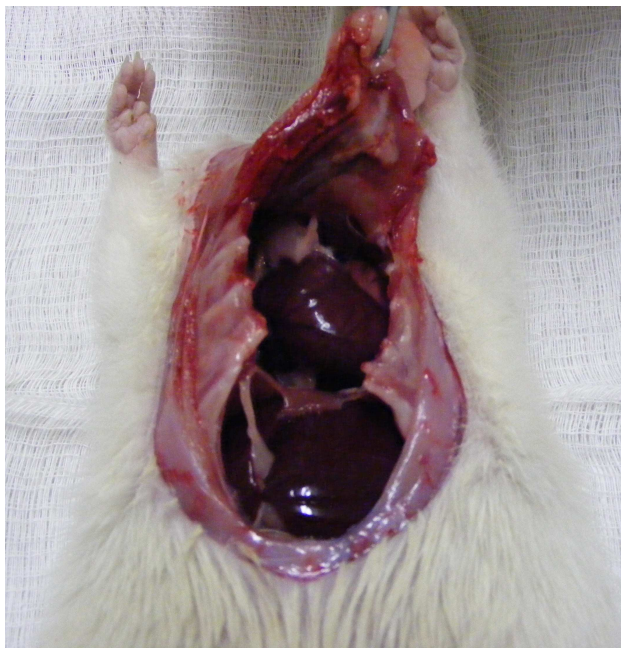


Figura 14 – Acesso cirúrgico para punção cardíaca.

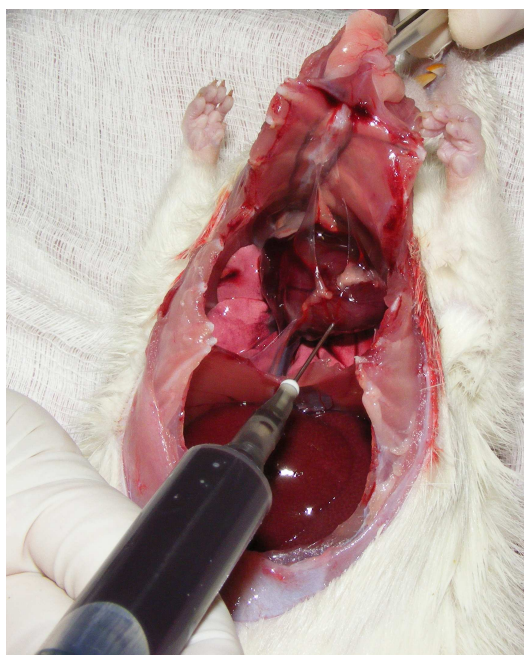


Figura 15 – Punção cardíaca.

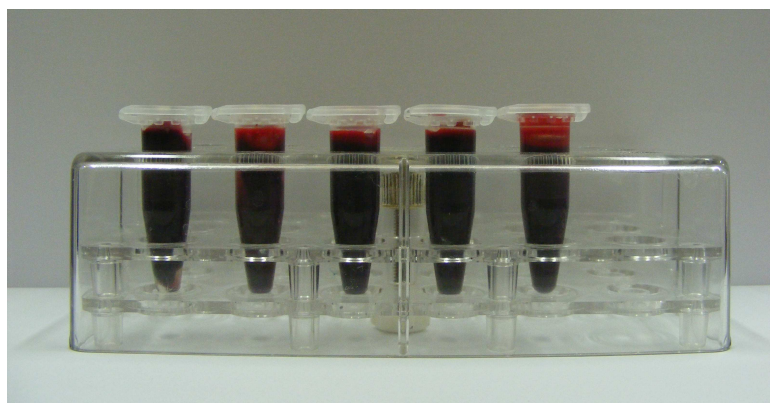


Figura 16 – Microtubos com coleta da punção cardíaca: pré-centrífuga.



Figura 17 – Microtubos dispensados na centrífuga.

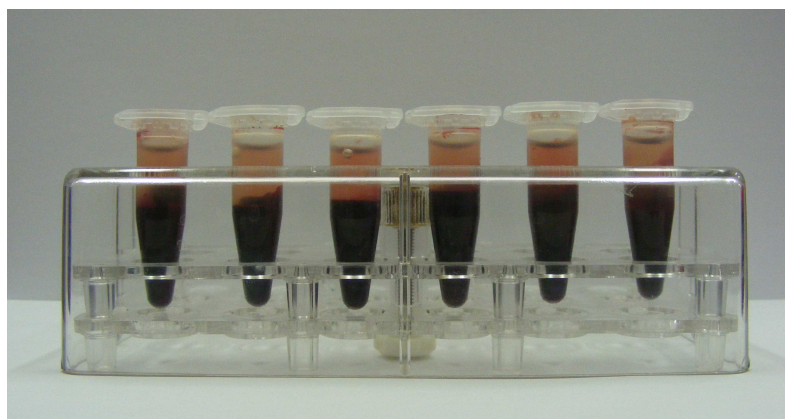


Figura 18 – Microtubos com coleta da punção cardíaca: pós-centrífuga.

3.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Este procedimento foi realizado no 21^o dia após a comprovação clínica da alveolite para os grupos N-21 e DN-21 e no 28^o dia após a comprovação clínica da alveolite para os grupos N-28 e DN-28. Para a coleta dos espécimens, os animais foram eutanasiados por dose excessiva dos anestésicos utilizados no item 3.2.3. Em seguida, a maxila direita foi separada da esquerda através de um bisturi montado com lâmina nº 11 e com o auxílio de uma tesoura de ponta romba realizou-se um corte tangencial a face distal do último molar, o que permitiu a obtenção completa do alvéolo a ser estudado (ARAÚJO, 2006) (Figura 19). Após, os animais foram encaminhados ao setor de descarte biológico da UFPE.

Posteriormente, estes espécimens foram fixados em solução de formol a 10% durante 24 horas, lavados em água corrente e descalcificados em solução de citrato de sódio e ácido fórmico em partes iguais por 35 dias (MORSE, 1945; POI et al., 2000). A descalcificação era comprovada mecanicamente pela inserção de uma agulha fina. Em seguida, as peças foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, clarificadas em xilol e incluídas em parafina histológica, de modo que sua orientação permitisse à realização de cortes dos alvéolos no sentido longitudinal (Figura 20). Através da técnica empregada por Tolosa (2003), foram obtidos por microtomia, cortes semi-seriados com espessura de aproximadamente 6µm, os quais foram corados pela hematoxilina-eosina. Após, as preparações foram montadas com entellan[®], observadas e fotomicrografadas através de microscópio óptico.

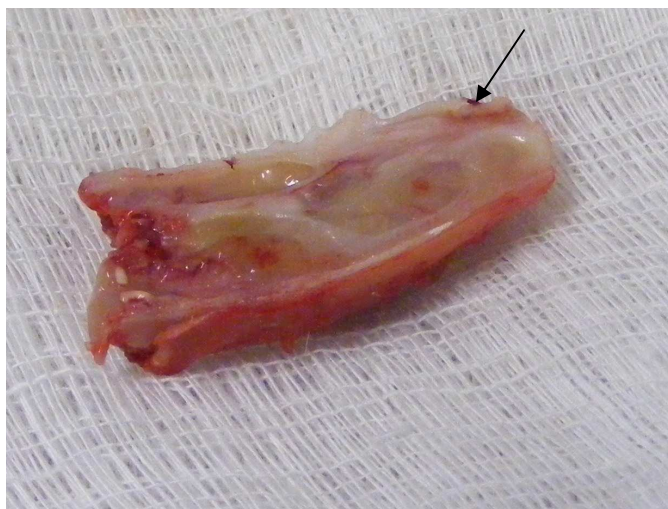


Figura 19 – Espécimen de hemi-maxila direita, mostrando obtenção completa do alvéolo dentário. Observar: orifício de entrada (seta).



Figura 20 – Micrótomo utilizado para realizar cortes semi-seriados do alvéolo dentário.

3.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para a descrição dos resultados histológicos, o alvéolo dental foi dividido em três terços – apical, médio e cervical (ARAÚJO, 2006). Em cada um destes terços, o estágio de cicatrização foi averiguado através do sistema de análise de imagem constituído por microscópio óptico acoplado com microcâmara Motic® e microcomputador contendo o programa Motic Image Plus® (Figura 21). Este permitiu medir em micrômetros as seguintes estruturas histológicas: tecido ósseo, tecido conjuntivo, coágulo e tecido inflamatório.



Figura 21 – Sistema de análise de imagem.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados pelo programa Jandel SigmaStat Statistical Software[®]. A estatística descritiva foi realizada através da média e desvio padrão. O valor de p foi obtido através do teste t para os dados paramétricos e do teste de Mann-Whitney para os dados não paramétricos. A significância estatística foi considerada, admitindo-se um nível crítico de 5%, em todos os casos.

RESULTADOS



4 RESULTADOS

A partir dos resultados obtidos foram escritos dois artigos científicos originais, os quais foram submetidos a revistas especializadas de circulação internacional.

4.1 PRIMEIRO ARTIGO ORIGINAL

O primeiro artigo original deste estudo foi intitulado: **“Peri-alveolar bacterial microbiota and bacteremia after dental alveolitis in adult rats submitted to neonatal malnutrition”**. Este artigo foi submetido como artigo original ao British Journal of Nutrition, que é classificado pela CAPES como qualis A2 para área de medicina II (ANEXO B).

Neste artigo foram analisados os aspectos bacteriológicos durante processo de alveolite dentária, relacionando-o com maior ocorrência de bacteremia em ratos adultos precocemente desnutridos. Antes e depois da extração evidenciou-se menor crescimento bacteriano dado por unidade formadora de colônia (UFC) na região peri-alveolar de incisivos superiores direito dos animais desnutridos, tal fato ocorreu de forma inversa após a alveolite, onde se constatou uma maior quantidade de UFC nestes animais. O percentual de hemoculturas positivas obtido após a alveolite foi maior nos animais desnutridos. Assim sendo, este estudo demonstrou a influência da desnutrição durante a alveolite dentária na microbiota peri-alveolar e no desenvolvimento da bacteremia.

Peri-alveolar bacterial microbiota and bacteremia after dental alveolitis in adult rats submitted to neonatal malnutrition

Flávia Regina Gonçalves de Araújo^{1,2} *, Célia Maria Machado Barbosa de Castro^{1,2,3}, Judith Advíncula Rocha¹, Bruno Sampaio¹, Maria de Fátima Alves Diniz¹, Liriane Baratella Evêncio⁴

¹*Microbiology Division, Laboratory of Immunopathology Keizo-Asami, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil*

²*Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil*

³*Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil*

⁴*Department of Histology, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil*

* Corresponding author: Flávia Regina Gonçalves de Araújo, Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil. Phone: +55 81 21268484, Fax: +55 81 21268485. E-mail: flavia_regina_@hotmail.com

Abstract

The aim of this study was to analyze bacteriological aspects during the process of dental alveolitis, relating it to a higher incidence of bacteremia in undernourished adult rats. We used 40 Wistar male rats, suckled by mothers fed a diet during lactation containing 17% protein in the nourished group (N) or 8% protein in the undernourished group (UN). After weaning, the animals received the Labina standard diet. After 90 days, these animals underwent upper right incisor extraction and induction of alveolitis. The oral microbiota was obtained using a swab and blood culture through the venous blood. These procedures were performed before the extraction, 5 minutes after extraction, on the 21st day after the alveolitis for groups N-21 and UN-21 and on the 28th day after the alveolitis for groups N-28 and UN-28. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The t test was used for parametric data and the Mann-Whitney test for nonparametric data. Statistical significance was considered by assuming a critical level of 5%. Before and after extraction a lower bacterial growth was observed per colony forming units (CFU) in the peri-alveolar region of the upper right incisors of undernourished animals, while the opposite was true after alveolitis, when a larger number of CFU was seen in these animals. The percentage of positive blood cultures obtained after the alveolitis was greater in the undernourished animals. This study thus demonstrated the influence of malnutrition during dental alveolitis in the peri-alveolar microbiota and during the development of bacteremia.

Peri-alveolar microbiota; Bacteremia; Dental alveolitis; Neonatal malnutrition

Introduction

Despite the technical and scientific advances in the field of dentistry, particularly in relation to dental procedures, in which it is possible to make use of preventive and curative therapeutic measures that allow us to maintain the tooth in the oral cavity, we note that it is even quite common to come across situations in which tooth extraction is the most appropriate treatment option.

It is important to emphasize that this less conservative management often involves the poorer and more undernourished segment of the population because their socioeconomic status does not allow them adequate food intake⁽¹⁾, oral hygiene practices, or the use of therapeutic resources to prevent the loss of their teeth, because in most cases, they are treated in public services, which do not provide sufficient resources to perform atraumatic surgical techniques and which conform to the principles of an aseptic chain⁽²⁾. Thus, these patients often suffer considerable postoperative pain and can even develop a severe condition known as alveolitis⁽³⁻⁵⁾. The signs and symptoms most commonly found in this disease are exposed alveolar bone, absence of tissue healing, purulent secretion, edema, hyperemia, lymphadenopathy, severe and throbbing pain and fetid and persistent odor⁽⁴⁻⁶⁾.

Malnutrition takes on major proportions in Brazil and is present in all regions and areas, although the population most affected lives in the North and Northeast⁽⁷⁾. The author in question argues that undernourished individuals manifest clinical signs of inadequate quantity (energy) or quality (nutrients) from the diet or as a result of diseases that cause poor biological utilization of the food ingested. Thus, malnutrition was identified as a major cause of secondary disability in the response of the organism to infectious agents, favoring even the progression of a localized infection in systemic⁽⁸⁾.

The oral cavity presents one of the most concentrated and varied microbial populations, harboring more than 500 species of bacteria⁽⁹⁾.

Most of these microorganisms are to be found in the oral cavity of healthy individuals constituting the endogenous microbiota, which is also known as normal microbiota⁽¹⁰⁾. This may benefit the host through the development of the immune system⁽¹¹⁾ or the microbial antagonism, thereby preventing the excessive growth of harmful microorganisms^(12,13). The occurrence of an imbalance between this microbiota and the host favors the onset of inflammatory and/or infectious processes⁽¹³⁾. In these cases, the microorganisms belonging to the normal microbiota are referred to as opportunistic pathogens⁽¹⁴⁾.

Many microorganisms normally considered non-pathogenic have the ability to produce infection and disease. This property depends not only on their virulence factors, but also on the defense mechanisms of the host, which may be weakened in some situations, such as nutritional deficiency, immunosuppressive drugs, acquired immunodeficiency syndrome, diabetes mellitus, cancer, infections, among others⁽¹⁵⁾.

The risk of postoperative complications increases considerably in immunocompromised or undernourished patients, owing to their diminished resistance. This includes greater vulnerability to disease, delayed wound healing and high rates of infection^(16,17). These, in turn, may lead to septicemia, whose mortality risk is high^(18,19).

Oral diseases usually exhibit a self-limiting behavior. Thus, clinical procedures such as periodontal probing, dental extraction or even a thorough brushing can cause the introduction and spread of bacteria from the flora of the oral cavity into the bloodstream triggering a transient bacteremia. This, in a normal organism, is asymptomatic, of short-duration (eliminated in a few minutes by the reticuloendothelial system of the host) and has no major clinical significance, because the inoculum is small and the virulence of microorganisms involved is low^(3,20,21).

Bacteremia has been defined as the presence of viable bacteria in blood⁽²²⁾. This allows the installation of bacteria in different body sites⁽²³⁾. However, the clinical importance of bacteremia is determined by several factors, such as the site of infection, severity of primary disease, type of pathogen involved and the patient's immunity^(24,25). Extractions are the dental procedure most likely to cause bacteremia^(26,27).

This present study analyzed the bacteriological aspects during the process of alveolitis, relating it to a higher incidence of bacteremia in adult rats undernourished during the suckling period and recovered thereafter until adulthood. The study of these aspects in animals is important from the experimental and clinical standpoints, due to nutritional aggression during the neonatal period. This represents a stage of great vulnerability, due to the formation of various organic systems, particularly the defense of the host against infection.

Materials and methods

Ethical Considerations

This research was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Center for Biological Sciences of the Federal University of Pernambuco (protocol number 008283/2007 – 34).

Animals

A total of 40 albino male Wistar rats, from the breeding colony of the Department of Nutrition of the Federal University of Pernambuco were used. These animals were kept in a bioterium at a temperature of $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ in a light/dark cycle of 12 hours (light - 6 to 18h; dark - 18 to 6h).

- Nutritional manipulation

After birth, the male pups were kept with their mothers in groups of six as this number helps to maintain the nutritional pattern⁽²⁸⁾. Thus, when necessary, we carried out a reduction or complementation of the offspring through a random selection of male pups. It is noteworthy that in the case of complementation, this was conducted using other litters of the same age. Then, on the basis of the dietary regimen employed, we obtained the following groups, each of which comprised 20 animals:

Nourished (N): pups whose mothers were fed with 17% casein during the period of lactation.

Undernourished (UN): suckled rats whose mothers were fed through a nutritionally deficient diet, 8% casein, during lactation.

After weaning, the mothers of both groups were euthanized.

- Somatic growth

The nourished and malnourished animals were breastfed until the 21st day after birth, corresponding to the lactation period⁽²⁹⁾. During this period a daily record was kept (digital electronic weighing scale - Marte, model S-4000-with a sensitivity of 0.1 g) of the body weight of each animal to monitor weight during nutritional manipulation. From the 22nd day of life, the animals were separated from their mothers, kept in collective cages containing three animals each and fed *ad libitum* water and the standard diet of the bioterium (Labina - Purina Brazil S/A), containing 23 % mixed protein until the end of the experiment. Their body weights were measured once a week, thus allowing their nutritional recovery to be monitored.

- Induction process of alveolitis

After 90 days all 40 animals (nourished and undernourished), underwent the alveolitis process.

To implement this step, the animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (10 mg/kg) + xylazine hydrochloride (0.5 mg/kg), associated in the same syringe and administered intramuscularly. Next, the upper right incisor was extracted, using the technique

proposed by Okamoto & Russo⁽³⁰⁾, in which the instruments used were similar to those employed in the extraction of primary teeth. After extraction, an alveolar ischemia was induced by the insertion of a small sterile cotton pad soaked in 1:1000 adrenaline for 15 minutes. Following the removal of this cotton, the animals remained under observation for 15 minutes, with the aim of verifying the absence of blood clot formation inside the alveolus, and after 48 hours, the animals were examined clinically, by separation of the lips, which allowed us to observe the development of the alveolitis by the presence of local edema, hyperemia, abscess formation, purulent secretion and fetid odor⁽³¹⁻³³⁾.

From the time of extraction to the day of euthanasia, the animals were kept separately in individual polypropylene cages covered with zinc wire, following which both the **Nourished (N)** and **Undernourished (UN)** rats were randomly separated into the following groups:

- a) Group N-21 – nourished animals that were euthanized on the 21st day after the clinical verification of alveolitis;
- b) Group UN-21 – undernourished animals that were euthanized on the 21st day after the clinical verification of alveolitis;
- c) Group N-28 – nourished animals that were euthanized on the 28th day after the clinical verification of alveolitis;
- d) Group UN-28 – undernourished animals that were euthanized on the 28th day after the clinical verification of alveolitis.

It is noteworthy that each group comprised 10 animals.

Bacteriological Analysis

For this analysis, the animals were anesthetized using the same technique as that employed for the process of induction of alveolitis. The operating table was covered with a sterile surgical drape and the animal was positioned in the dorsal decubitus position. This position facilitated the mouth opening and separation of the lips, thus allowing the collection of the oral microbiota from the peri-alveolar region of the upper right incisor, according to the technique advocated by Araújo⁽³²⁾ and Araújo et al⁽³⁴⁾, using a swab soaked in 40µL of 0.9% sterile NaCl. The swab was then placed in a sterile tube containing 460µL of Brain Heart Infusion (BHI) enriched liquid medium that allows bacterial growth. The samples were homogenized and 100µl of each was removed and transferred to another sterile tube containing 900µl of BHI. This 1000µL was again homogenized and, with the aid of a 1µL calibrated loop, Petri dishes were seeded containing Agar-blood and Agar-Levine for isolation

of the gram-positive and gram-negative bacteria. These plates were incubated in a bacteriological incubator at 37°C for 48 hours and the resulting colony forming units (CFU) were counted and their percentages calculated. The enterobacteria kit was used for identification of the gram-negative bacteria and Staphclin, Novobiocin, Optochin, Bile Esculin Agar and 6.5% NaCl for the identification of the gram-positive bacteria. In addition, slides were prepared from dry swabs at room temperature. These were fixed by heat by means of the flame of the Bunsen burner, with subsequent staining by Gram's method, which enabled the identification of the bacterial forms and arrangements.

This procedure was performed before extraction of the upper right incisor, five minutes after the extraction, on the 21st day after the clinical verification of alveolitis for groups N-21 and UN-21 and on the 28th day after the clinical verification of alveolitis for groups N-28 and UN-28.

Blood Culture

One hundred microliters (100 µL) of venous blood was collected from the tail of each animal to perform the blood culture prior to extraction of the upper right incisor, five minutes after the extraction, on the 21st day after the clinical verification of alveolitis for groups N-21 and UN-21 and on the 28th day after the clinical verification of alveolitis for groups N-28 and UN-28. The blood was collected in tubes containing 900µL of sterile BHI medium and hermetically sealed. After that, the tubes were placed in a bacteriological incubator at 37°C for 7 days. The cultures were seeded in Petri dishes containing Agar-blood every 24, 48, 72, 120 and 168 hours. Blood cultures were regarded as positive in the first of these intervals in which the presence of bacteria was observed. This was identified through tests similar to those previously mentioned for carrying out the bacteriological analysis of normal oral microbiota from the peri-alveolar region. Blood cultures were considered negative when, after 7 days of observation, no microorganisms were present in the seeding.

Statistical Analysis

The data were analyzed by a statistician using the "Jandel SigmaStat Statistical Software." Descriptive statistics were performed using the mean and standard deviation. The p value was obtained using the t test for parametric data and the Mann-Whitney test for nonparametric data. Statistical significance was set at the 5% level in all cases.

Results

After the body weights of the nourished and malnourished animals had been recorded, a weight curve was constructed for each of these groups (Figure 1), on which the 4th to the 21st days revealed a difference between them ($p < 0.05$). This difference was also observed on the 30th, 60th and 90th days of life of these animals ($p < 0.05$).

Body weight was also examined before extraction and after alveolitis in all groups: N-21, UN-21, N-28 and UN-28 (Figure 2). Within each group, only the N-21 showed an increase in weight after alveolitis ($p < 0.05$). However, when making a comparison between groups N-21 x UN-21 and N-28 x UN-28 both before extraction and after alveolitis, it was observed that the weights of the undernourished animals were always lower than those of the nourished ones ($p < 0.05$).

The CFUs found in the peri-alveolar region of the upper right incisors of rats were calculated before extraction, after extraction and after alveolitis in all groups: N-21, UN-21, N-28 and UN-28 (Figure 3). When the times before and after extraction within each group were compared, it was found that there was a significant reduction in the number of CFUs after extraction ($p < 0.05$). In view of the comparison between groups N-21 x UN-21 and N-28 x UN-28 both before and after extraction, fewer CFUs were detected in the undernourished group ($p < 0.05$); the opposite occurred after alveolitis, which demonstrated a greater number of CFUs in undernourished group ($p < 0.05$).

The gram-positive and gram-negative bacterial species observed in the peri-alveolar region of the upper right incisors of rats were recorded before extraction, after extraction and after alveolitis in groups N-21 and UN-21 (Figure 4). A comparison between the time before and after extraction within these groups showed that only the number of gram-positive bacteria in group N-21 decreased after extraction ($p < 0.05$). When groups N-21 x UN-21 were compared before and after extraction, it was found there were fewer gram-positive bacteria in the undernourished animals than in the nourished ones ($p < 0.05$). However, this situation was reversed after the alveolitis, when there were more gram-positive bacteria in the undernourished animals than in the nourished ones ($p < 0.05$). When the gram-positive and gram-negative bacteria were compared, there was a difference ($p < 0.05$) in group N-21 and in group UN-21 before and after extraction and after alveolitis.

The gram-positive and gram-negative bacterial species observed in the peri-alveolar region of the upper right incisors of rats were recorded before extraction, after extraction and after alveolitis in groups N-28 and UN-28 (Figure 5). In view of the comparison between the

time before and after extraction within these groups, it was clear that the number of gram-positive bacteria decreased after extraction ($p < 0.05$). When groups N-28 x UN-28 were compared before extraction, it was observed that the number of gram-positive bacteria in the undernourished animals was lower than in the nourished ones ($p < 0.05$). However, this picture was reversed after alveolitis, when it was possible to find more gram-positive and gram-negative bacteria in the undernourished animals than in the nourished ones ($p < 0.05$). A comparison between the gram-positive and gram-negative bacteria showed a difference ($p < 0.05$) in group N-28 and in group UN-28 before and after extraction and after alveolitis.

The percentage of positive blood cultures before extraction, after extraction and after alveolitis was determined in all animals in groups N-21, UN-21, N-28 and UN-28 (Figure 6). When comparing groups N-21 x UN-21 and N-28 x UN-28 after alveolitis, it was observed that the percentage was higher in the undernourished animals than in the nourished ones ($p < 0.05$).

The bacteria in blood cultures of groups N-21 and UN-21 before and after extraction and after alveolitis are shown in Table 1. When comparing these groups after alveolitis, there was a larger number of positive cases in the undernourished animals, and *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus* were the most frequently encountered species.

The bacteria in blood cultures of groups N-28 and UN-28 before and after extraction and after alveolitis are shown in Table 2. In view of the comparison between these groups after alveolitis, a larger number of positive cases was found in the undernourished animals, *Staphylococcus saprophyticus*, being the most frequent species.

Discussion

A reduced blood supply impairs the healing of any wound and facilitates the onset of an infectious process⁽³⁵⁾. This was demonstrated during the course of this study: after the extraction of the upper right incisor of rats, a alveolar ischemia was induced by the insertion of a small sterile cotton pad soaked in 1:1000 adrenaline for 15 minutes and after its removal no blood clot formation was seen inside the alveolus; after 48 hours, however, the development of dental alveolitis was observed in all animals.

In this study, neonatal malnutrition triggered by an 8% casein low protein diet led to a deficit in body weight by causing a delay in weight gain during the lactation period from the fourth day of life. These data are consistent with those of Porto et al.^(36,37) and Severo⁽³⁸⁾, who used the same diet and were able to show similar effects from the fifth day of life in the

former and from the fourth day of life in the latter. Another experimental model of malnutrition was used by Wanderley⁽³⁹⁾, Barros et al.⁽⁴⁰⁾ and Andrade et al.⁽⁴¹⁾, which was applied to a regional basic diet (RBD) with 7.87% protein⁽⁴²⁾. It is noteworthy that the effects of both diets were proven, since they adversely affected the protein content of the breast milk, thereby producing their deleterious effects on offspring. However, in the present study it was used 8% casein, owing to the fact that its administration is advocated internationally as a standard experimental diet capable of inducing malnutrition.

With respect to neonatal malnutrition, the influence of a low protein diet in the animals' body weight until adulthood – 30, 60 and 90 days of life – was also verified in this experiment, because even with the administration of a balanced diet - Labina (standard bioterium diet containing 23% mixed protein) after weaning, the body weight of the undernourished animals remained lower than that of the nourished animals. These results corroborate those of other studies^(36-41,43), in which the body weight of undernourished animals remained low in adulthood, even when they were submitted to nutritional recovery.

Quantitative and qualitative changes in oral microbiota were observed in this study when comparing the times before extraction, after extraction and after alveolitis within each group and between groups. Thus, with respect to quantitative aspects, in making a comparison between the periods before and after extraction within each group, it was observed that there was a reduction in CFUs after extraction; this was probably due to the mechanical removal performed during the process of inducing alveolitis. These results are consistent with those cited by Araujo⁽³²⁾. A comparison between groups N-21 x UN-21 and N-28 x UN-28 both before and after extraction revealed that there were fewer CFUs in the undernourished animals. However, this situation was reversed after alveolitis, because there was a larger number of CFUs in these animals. These data enable us to make an analogy with reports from Porto et al.⁽³⁷⁾ that indicate that when the usual number of resident microorganisms is greatly reduced, the opportunistic invaders establish themselves more easily. As for qualitative aspects, when comparing the gram-positive and gram-negative bacteria, differences were observed before extraction, after extraction and after alveolitis in all groups; in undernourished animals, however, there was a further development of gram negative bacteria, especially in group UN-28. These changes were consistent with those reported by Chow⁽⁴⁴⁾ and Darby & Curtis⁽⁴⁵⁾, in which diet and infectious processes are able to produce changes in the composition of oral microbiota. It is noteworthy that the gram-negative bacteria are those having a higher pathogenic potential⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

Oral infections are typically local, but they can serve as a focus for systemic infections^(49,50). There are three possible mechanisms by which oral infections can trigger infections at a distance: metastatic infection due to the translocation of microorganisms; metastatic injury as a result of the movement of toxins from oral microorganisms and metastatic inflammation caused by immunologic injury induced by oral microorganisms⁽⁵¹⁾. The diagnosis of bacteremia is obtained through the detection of viable bacteria in the bloodstream, and the obtaining of blood cultures was recommended as being the most sensitive method for identifying the condition⁽⁵²⁾. Thus, in this study, the development of bacteremia in nourished and undernourished rats was confirmed by performing blood cultures, whose results were positive. However, bacteremia may be transient, that is, when its duration does not exceed one hour and microorganisms are rapidly destroyed by the defenses of the host, or permanent, that is, when the bacteria are not eliminated from the body and remain in the bloodstream^(53,54). The latter is usually associated with predisposing factors in the patient, one of which is malnutrition^(55,56). In this study, after the onset of alveolitis, bacteremia was detected in 30% of the animals in the N-21 group, 80% of those in the UN-21 group, 20% of those in the N-28 group and in 80% of those in the UN-28 group. This result therefore shows a higher percentage of positive blood cultures in undernourished animals, probably due to their compromised immune system.

The oral microbiota from the peri-alveolar region of rats is composed of the following bacteria: *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus* coagulase negative, *Enterococcus* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia liquefaciens*⁽³⁴⁾. The microorganisms normally found in the oral cavity are responsible for a large number of bacteremia⁽⁵⁷⁾. Thus the findings of this experiment are consistent with this last statement, since all bacterial species present in blood culture (*Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negative and *Staphylococcus saprophyticus*) were part of the endogenous microbiota from the peri-alveolar region of the upper right incisor of the rat.

The bacterial species *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus* coagulase negative were identified in most of the diagnoses of bacteremia⁽⁵⁸⁾. This was clearly demonstrated in the present study, because 50% of the positive blood cultures from the animals in groups UN-21 and UN-28 harbored these bacteria after alveolitis.

An epidemiological study of sepsis and causative agents in children showed that malnutrition was a risk factor for the onset of the septic condition in childhood, because

71.1% of children who had episodes of sepsis were undernourished and the predominant bacterium in the blood cultures was *Staphylococcus aureus*⁽⁵⁹⁾. These findings were also observed in our experiment because, after alveolitis, the undernourished animals showed a higher percentage of positive blood cultures with *Staphylococcus aureus* being one of the most frequently encountered bacteria.

The development of sepsis in burned patients was caused mostly by gram-positive bacteria and the most common of these was *Staphylococcus aureus*⁽⁶⁰⁾. These findings may be related to those of the present study, since bacteremia was triggered only by gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus* being one of the bacterial species most commonly found in the blood cultures of undernourished animals.

Neonatal malnutrition can cause sequelae in the body's defenses, thus representing a high risk factor for the development of bacteremia, and *Staphylococcus coagulase negative* is its main etiologic agent⁽⁶¹⁾. In this study, malnutrition was able to trigger a higher percentage of positive blood cultures after alveolitis, and *Staphylococcus coagulase negative* was one of the causative agents.

Conclusion

Thus, based on the results of this study and review of the literature, it was possible to verify the importance of this study for the area of dentistry, since it clearly and decisively demonstrated the influence of nutritional status during the process of dental alveolitis, both as regards the composition of the microbiota from the peri-alveolar region and the development of bacteremia, thereby revealing the existence of a direct relationship between oral and systemic diseases.

Acknowledgements

This research was supported by LIKA-UFPE (Laboratory of Immunopathology Keizo-Asami, Federal University of Pernambuco) and CAPES (Coordination of Further Training of Higher Education Personnel).

The survey was designed by F. R. G. de A. e C. M. M. B. de C. All the authors contributed to the collection and interpretation of the data, as well to the drafting of the manuscript.

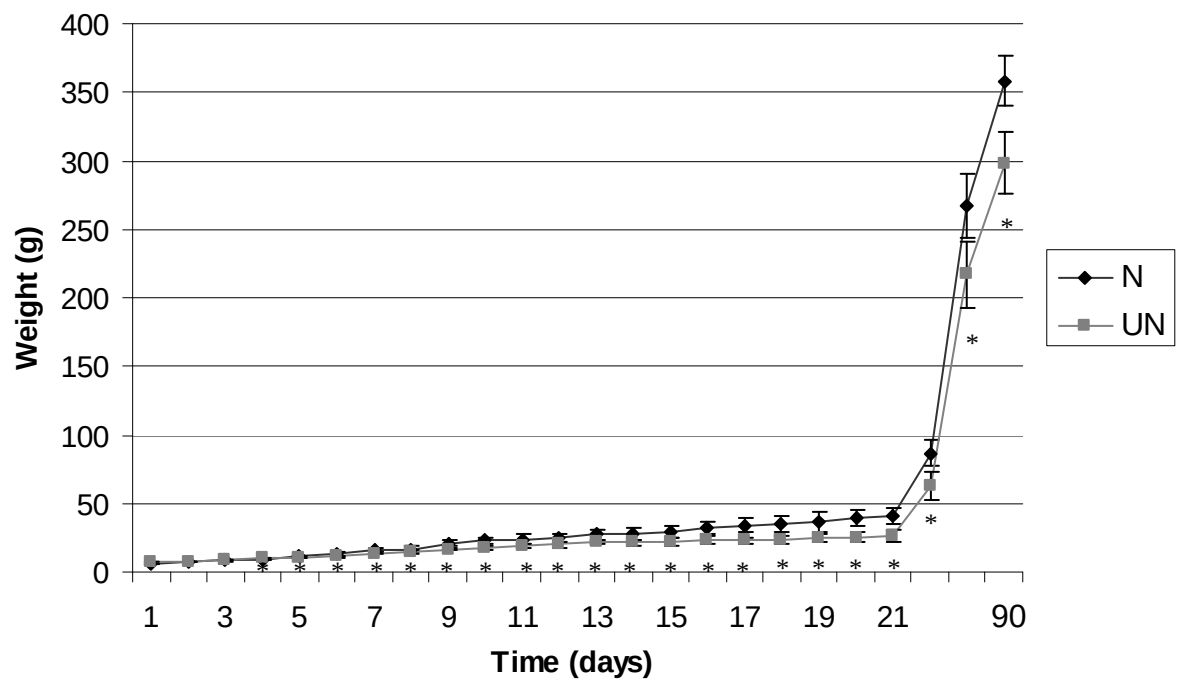
The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Shahar D, Shai I, Vardi H *et al.* (2005) Diet and eating habits in high and low socioeconomic groups. *Nutr* **21**, 559-566.
2. Adeyemo WL (2004) Etiology of dry socket: additional factors. *J Oral Maxillofac Surg* **62**, 519-520.
3. Papa ED (2000) Disseminación de la infección odontogénica: Revisión de la literatura. *Acta Odontol Venez* **38**, 18-32.
4. Nusair YM & Younis MHA (2007) Prevalence, clinical picture, and risk factors of dry socket in a Jordanian Dental Teaching Center. *J Contemp Dent Pract* **8**, 53-63.
5. Resende TJD (2009) Alveolite: evidências científicas. Monografia, Universidade Fernando Pessoa, Porto.
6. Ricieri CB, Aranega AM, Takahashi A *et al.* (2006) Alveolite: ocorrência e tratamento em consultórios odontológicos de Araçatuba/SP. *Rev Fac Odontol Lins* **18**, 33-40.
7. Monteiro CA (2003) A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. *Estud Av* **17**, 7-20.
8. Chandra RK (1997) Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J of Clin Nutr* **66**, 460-463.
9. Dufour T & Svoboda JM (2005) Pathogénie bactérienne des parodontolyses. *EMC Odontol* **1**, 46-57.
10. Rodrigue L & Lavoie MC (1996) Comparison of the proportions of oral bacterial species in BALB/c mice from different suppliers. *Lab Anim* **30**, 108-113.
11. Marcotte H & Lavoie MC (1998) Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 71-109.
12. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL *et al.* (2001) Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* **183**, 3770-3783.
13. Ye P, Harty DWS, Chapple CC *et al.* (2003) *Streptococci* and *Actinomyces* induce antibodies which cross react with epithelial antigens in periodontitis. *Clin Exp Immunol* **131**, 468-476.
14. Pelczar MJ Jr, Chan ECS & Krieg NR (1996) Flora normal do corpo humano. In: *Microbiologia Conceitos e Aplicações*, 2nd ed., pp. 22-40 [MJ Pelczar Jr, ECS Chan and NR Krieg, editors]. São Paulo: Makron Books.
15. Souza CAI & Scarcelli E (2000) Agressão por microrganismos da microbiota endógena. *Arq Inst Biol* **67**, 275-281.
16. Neumann M, Friedmann J, Roy MA *et al.* (2004) Provision of high-protein supplement for patients recovering from hip fracture. *Nutrition* **20**, 415-419.
17. Ohyanagi H (2004) Introduction to the state of the art of nutrition support in Japan. *Nutrition* **20**, 339.
18. Yeh CL (2004) Specific nutrient: role of arginine in sepsis. *Nutrition* **20**, 581-582.
19. Griffiths RD (2004) Keeping up the defenses. *Nutrition* **20**, 587-589.
20. Rocha Barros VM, Ito IY, Azevedo RVP *et al.* (2000) Bacteremia após exodontia unitária, empregando dois métodos de anti-sepsia intrabucal. *Pesqui Odontol Bras* **14**, 19-24.
21. Siviero M, Kanegane K, Bispo CGC *et al.* (2009) Evolução das alterações e atualizações do protocolo 2007 da American Heart Association para prevenção da endocardite infecciosa. *Rev Inst Ciênc Saúde* **27**, 176-180.
22. Salles MJC, Sprovieri SRS, Bedrikow R *et al.* (1999) Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepsis – revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. *Rev Assoc Med Bras* **45**, 86-92.

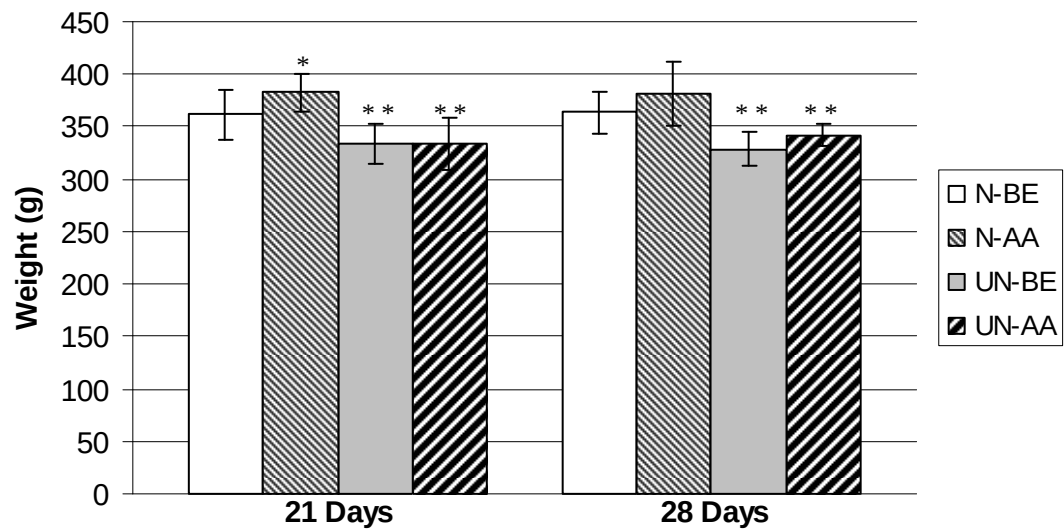
23. Bhatawadekar S & Bhardwaj R (2002) Actinomycotic bacteraemia after dental procedures. *Indian J Med Microbiol* **20**, 72-75.
24. Lam DK, Jan A, Sándor GKB *et al.* (2008) Prevention of infective endocarditis: revised guidelines from the American Heart Association and the implications for dentists. *J Can Dent Assoc* **74**, 449-453.
25. Lockhart PB, Brennan MT, Sasser HC *et al.* (2008) Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation* **117**, 3118-3125.
26. Bruno M (2007) Endocardite bacteriana em medicina dentária: profilaxia. *Revista FCS* **4**, 158-167.
27. Tsolka P & Katritsis D (2009) Infective endocarditis prophylaxis for dental procedures in 2009: what has changed? *Hellenic J Cardiol* **50**, 493-497.
28. Committee on Laboratory Animal Diets (1979) Assembly of Life Sciences. National Research Council. Control of Diet in Laboratory Animal Experimentation. *Nutr Abstr Rev* **40**, 413-419.
29. Harkness JE (1993) Biologia e manejo. In: *Biologia Clínica de Coelhos e Roedores*, pp. 9-55 [JE Harkness, editor]. São Paulo: Roca.
30. Okamoto T & Russo MC (1973) Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Araçatuba* **2**, 153-163.
31. Poi WR, Carvalho JAR Jr, Carvalho PSP *et al.* (2000) Influência da pasta Sultan sobre o processo de reparo em alvéolo dental infectado. Análise histológica em ratos. *ROBRAC* **9**, 9-13.
32. Araújo FRG (2006) Resposta bacteriológica e histológica em processo de alveolite em ratos (*Rattus norvegicus albinus*) tratados com *Mercurius solubilis*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
33. Araújo FRG, Castro CMMB, Severo MS *et al.* (2009) Effect of *Mercurius solubilis* on the bacteriological response in the alveolitis process in rats. *Homeopathy* **98**, 160-164.
34. Araújo FRG, Castro CMMB, Severo MS *et al.* (2007) Normal microbiota of the perialveolar region of incisors of rats. *Arq Bras Med Vet Zootec* **59**, 1586-1588.
35. Menezes LR Jr, Gaujac C & Trento CL (2009) Influência das alterações locais sobre o processo de reparo alveolar. *SaudPesq* **2**, 411-416.
36. Porto SMMS, Araújo FRG, Melo JF *et al.* (2006) Cinética do perfil leucocitário do sangue, antes e após treinamento físico moderado, em ratos adultos desnutridos no período neonatal. *An Fac Med Univ Fed Pernamb* **51**, 59-65.
37. Porto SMMS, Viana MT, Silva KMF *et al.* (2007) Desnutrição neonatal e microbiota normal da cavidade oral em ratos. *Rev Nutr* **20**, 625-632.
38. Severo MS (2009) Função microbica de macrófagos alveolares de ratos submetidos à desnutrição neonatal: estudo da infecção celular, in vitro, por *Staphylococcus aureus* meticilina-sensível e meticilina-resistente. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
39. Wanderley LG (2001) Influência do exercício físico sobre a lactação de ratas desnutridas pela dieta básica regional (DBR). Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
40. Barros KMFT, Manhães-De-Castro R, Lopes-De-Souza S *et al.* (2006) A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci* **9**, 99-104.
41. Andrade RF, Miranda MAO, Lucena ACT *et al.* (2007) Efeito de campos eletromagnéticos sobre o potencial microbica de macrófagos alveolares de ratos eutróficos ou desnutridos, infectados, in vitro, com *Candida albicans*. *An Fac Med Univ Fed Pernamb* **52**, 116-121.

42. Teodósio NR, Lago ES, Romani SAM *et al.* (1990) Regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr* **40**, 533-547.
43. Barreto-Medeiros JM, Feitoza EG, Magalhães K *et al.* (2004) Malnutrition during brain growth spurt alters the effect of fluoxetine on aggressive behavior in adult rats. *Nutr Neurosci* **7**, 49-52.
44. Chow AW (2000) Infections of the oral cavity, neck, and head. In: *Principles and Practice of Infectious diseases*, 5th ed., pp. 689-701 [GL Mandell, JE Bennett and R Dolin, editors]. Churchill Livingstone: Philadelphia.
45. Darby I & Curtis M (2001) Microbiology of periodontal disease in children and young adults. *Periodontol 2000* **26**, 33-53.
46. Rodrigues AM & Newman MG (2002) Microbiologia e imunologia periodontal. In: *Periodontia/Cirurgia/Cirurgia para implantes*, pp. 21-50 [RJA Cardoso and EAN Gonçalves, editors]. São Paulo: Artes Médicas.
47. Nishihara T & Koseki T (2004) Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol 2000* **36**, 14-26.
48. Socransky SS & Haffajee AD (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* **38**, 135-187.
49. Daniel FI, Granato R, Grando LJ *et al.* (2006) Carcinoma de células escamosas em rebordo alveolar inferior: diagnóstico e tratamento odontológico de suporte. *J Bras Patol Med Lab* **42**, 279-283.
50. Spolidorio DMP, Estrela C, Bedran TBL *et al.* (2010) Invasão microbiana: infecção focal e a relação com aterosclerose. *ROBRAC* **18**, 10-14.
51. Gonçalves ELM (2010) A importância da prevenção e da intervenção em doença periodontal pela equipe de saúde da família. Monografia (Especialização), Universidade Federal de Minas Gerais, Uberlândia.
52. Baitello AL, Neto RC, Filho BH *et al.* (2004) Prevalência e fatores associados à bacteremia nos portadores de colecistite aguda litiásica. *Rev Assoc Med Bras* **50**, 373-379.
53. Cury PR, Joly JC, Araújo VC *et al.* (2003) Periodontite: fator de risco para doenças sistêmicas? *Rev Gauch Odontol* **51**, 210-214.
54. Silva JM, Marceliano MFV, Souza PARS *et al.* (2007) Infecção endodôntica como fator de risco para manifestações sistêmicas: revisão da literatura. *Rev Odontol UNESP* **36**, 357-364.
55. Krebs VLJ & Taricco LD (2004) Fatores de risco para meningite bacteriana no recém-nascido. *Arq Neuropsiquiatr* **62**, 630-634.
56. Morais TMN, Silva A, Avi ALRO *et al.* (2006) A importância da atuação odontológica em pacientes internados em unidade de terapia intensiva. *Rev Bras Ter Intensiva* **18**, 412-417.
57. Ghizoni JS, Sant`ana ACP, Taveira LAA *et al.* (2008) Doença periodontal como fator coadjuvante para o desenvolvimento do acidente vascular encefálico e aterosclerose. *RFO UPF* **13**, 83-87.
58. Krebs VLJ, Pedroso CPA, Diniz EMA *et al.* (1999) Endocardite bacteriana como complicação de sepse neonatal – relato de caso. *Rev Assoc Med Bras* **45**, 371-374.
59. Ribeiro AM & Moreira JLB (1999) Epidemiologia e etiologia da sepse na infância. *J Pediatr* **75**, 39-44.
60. Macedo JLS, Rosa SC, Macedo KCS *et al.* (2005) Fatores de risco da sepse em pacientes queimados. *Rev Col Bras Cir* **32**, 173-177.
61. Brito DVD, Soares JP, Abdallah VOS *et al.* (2007) Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* em neonatos: incidência e fatores de risco. *Rev Ciênc Méd* **16**, 71-77.



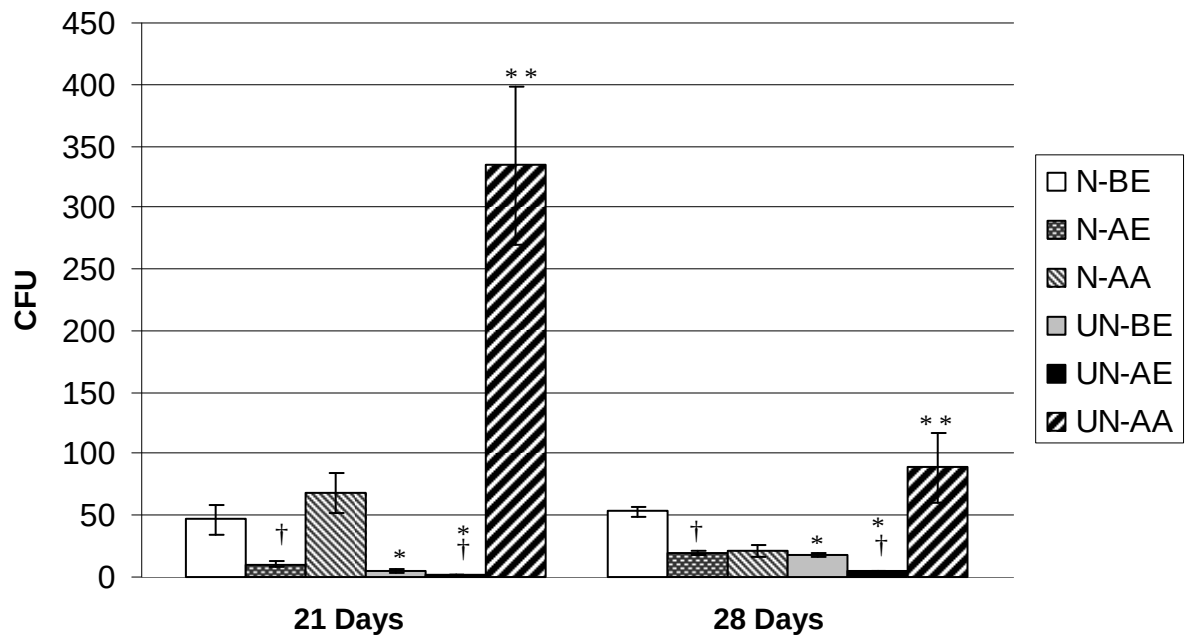
N = Nourished (n = 20); UN = Undernourished (n = 20). * = $p < 0.05$, comparing N and UN.

Figure 1 – Body weight of the nourished and undernourished animals from the 1st to 21st day of life and on the 30th, 60th and 90th days of life.



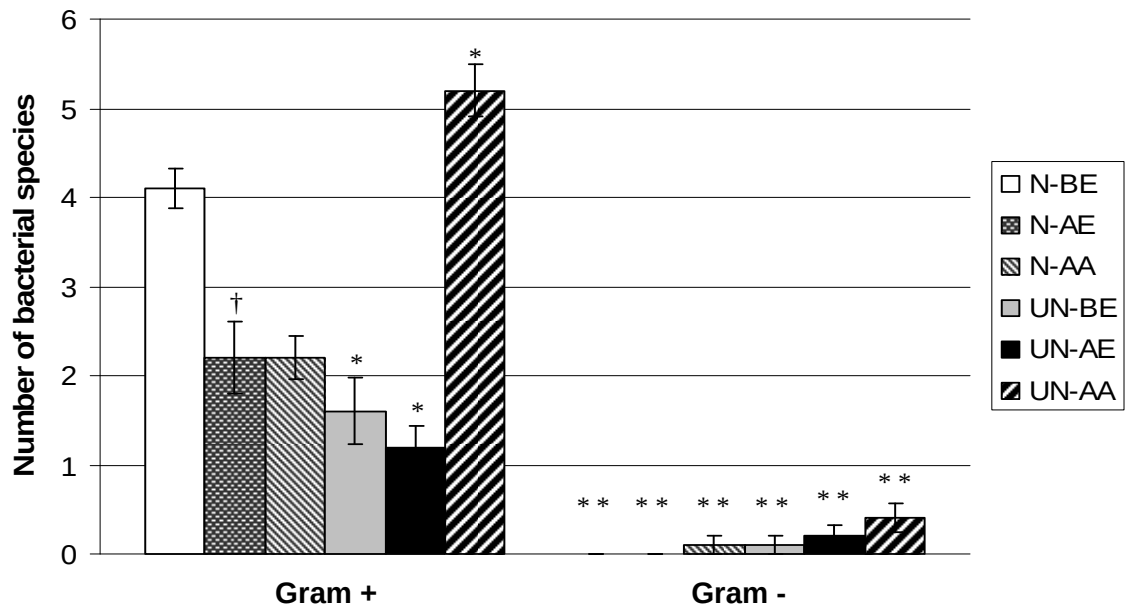
N-BE = Nourished before extraction; N-AA = Nourished after alveolitis; UN-BE = Undernourished before extraction; UN-AA = Undernourished after alveolitis. * = $p < 0.05$, comparing BE and AA to N with 21 days of alveolitis. * * = $p < 0.05$, comparing N and UN to BE and AA with 21 and 28 days of alveolitis. N-21(n=10); UN-21(n=10); N-28(n=10); UN-28(n=10).

Figure 2 – Body weight of animals belonging to groups N-21, UN-21, N-28 and UN-28 before extraction and after alveolitis.



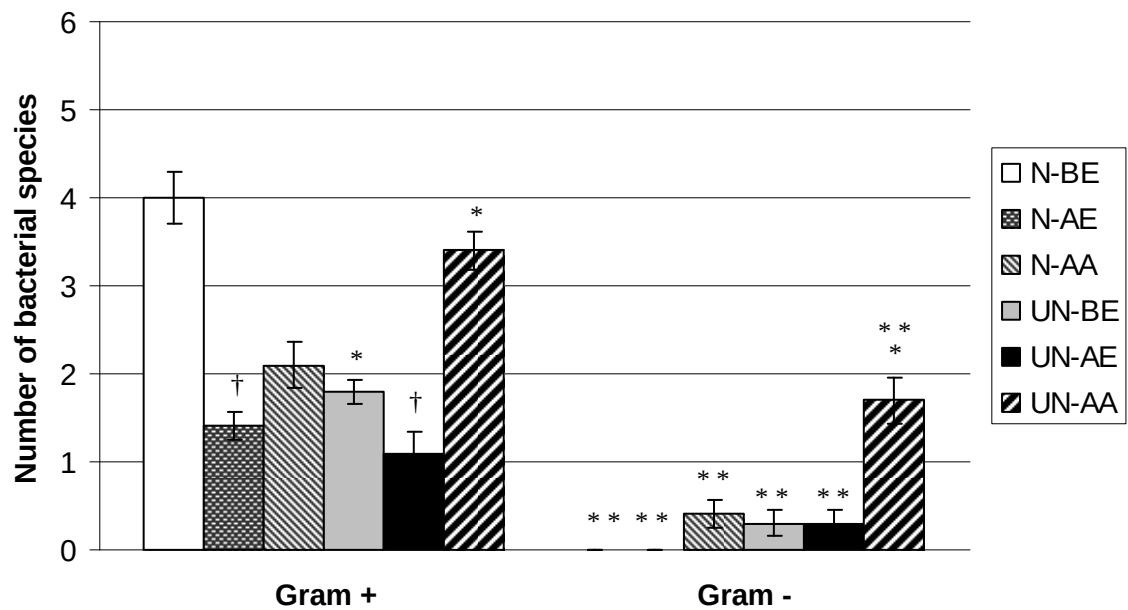
CFU = Colony forming unit; N-BE = Nourished before extraction; N-AE = Nourished after extraction; N-AA = Nourished after alveolitis; UN-BE = Undernourished before extraction; UN-AE = Undernourished after extraction; UN-AA = Undernourished after alveolitis. † = $p < 0.05$, comparing BE and AE to N and UN with 21 and 28 days of alveolitis. * = $p < 0.05$, comparing N and UN to BE and AE with 21 and 28 days of alveolitis. ** = $p < 0.05$, comparing N and UN to AA with 21 and 28 days of alveolitis. N-21(n=10); UN-21(n=10); N-28(n=10); UN-28(n=10).

Figure 3 – Frequency of Colony Forming Units observed in the peri-alveolar region of the upper right incisors of animals belonging to groups N-21, UN-21, N-28 and UN-28 before extraction, after extraction and after alveolitis.



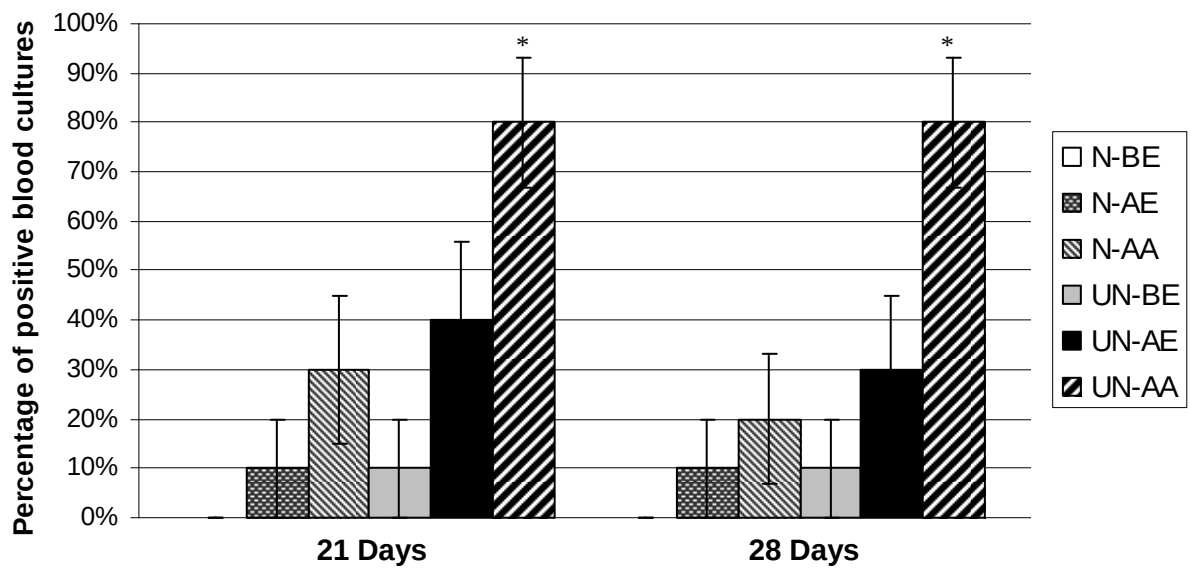
N-BE = Nourished before extraction; N-AE = Nourished after extraction; N-AA = Nourished after alveolitis; UN-BE = Undernourished before extraction; UN-AE = Undernourished after extraction; UN-AA = Undernourished after alveolitis. † = $p < 0.05$, comparing BE and AE to N in Gram +. * = $p < 0.05$, comparing N and UN to BE, AE and AA in Gram +. ** = $p < 0.05$, comparing Gram + and Gram - to N and UN in BE, AE and AA. N-21(n=10); UN-21(n=10); N-28(n=10); UN-28(n=10).

Figure 4 – Number of gram-positive and gram-negative bacterial species found in the peri-alveolar region of the upper right incisors of the animals of groups N-21 and UN-21 before extraction, after extraction and after alveolitis.



N-BE = Nourished before extraction; N-AE = Nourished after extraction; N-AA = Nourished after alveolitis; UN-BE = Undernourished before extraction; UN-AE = Undernourished after extraction; UN-AA = Undernourished after alveolitis. † = $p < 0.05$, comparing BE and AE to N and UN in Gram +. * = $p < 0.05$, comparing N and UN to BE and AA in Gram + and to AA in Gram -. ** = $p < 0.05$, comparing Gram + and Gram - to N and UN in BE, AE and AA. N-21(n=10); UN-21(n=10); N-28(n=10); UN-28(n=10).

Figure 5 – Number of gram-positive and gram-negative bacterial species found in the peri-alveolar region of the upper right incisors of the animals of groups N-28 and UN-28 before extraction, after extraction and after alveolitis.



N-BE = Nourished before extraction; N-AE = Nourished after extraction; N-AA = Nourished after alveolitis; UN-BE = Undernourished before extraction; UN-AE = Undernourished after extraction; UN-AA = Undernourished after alveolitis. * = $p < 0.05$, comparing N and UN to AA with 21 and 28 days of alveolitis. N-21(n=10); UN-21(n=10); N-28(n=10); UN-28(n=10).

Figure 6 – Percentage of positive blood cultures in the animals of groups N-21, UN-21, N-28 e UN-28 before extraction, after extraction and after alveolitis.

Table 1 - Distribution of the bacteria found in the blood cultures of the groups N-21 and UN-21 before extraction, after extraction and after alveolitis.

Bacterial species	Groups					
	BE	N-21 AE	AA	BE	UN-21 AE	AA*
<i>Bacillus</i> sp.	-	1-10%	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> sp.	-	-	-	-	-	1-10%
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	1-10%	1-10%	2-20%	3-30%
<i>Staphylococcus</i> coagulase negative	-	-	1-10%	-	-	1-10%
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	-	1-10%	-	2-20%	3-30%

N-21 = nourished animals that were euthanized on the 21st day after the clinical verification of alveolitis (n=10); UN-21 = undernourished animals that were euthanized on the 21st day after the clinical verification of alveolitis (n=10); BE = Before extraction; AE = After extraction; AA = After alveolitis. * = $p < 0.05$, comparing N and UN to AA after 21 days of alveolitis.

Table 2 - Distribution of the bacteria found in the blood cultures of the groups N-28 and UN-28 before extraction, after extraction and after alveolitis.

Bacterial species	Groups					
	BE	N-28 AE	AA	BE	UN-28 AE	AA*
<i>Bacillus</i> sp.	-	1-10%	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	1-10%	2-20%	2-20%
<i>Staphylococcus</i> coagulase negative	-	-	1-10%	-	-	2-20%
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	-	1-10%	-	1-10%	4-40%

N-28 = nourished animals that were euthanized on the 28th day after the clinical verification of alveolitis (n=10); UN-28 = undernourished animals that were euthanized on the 28th day after the clinical verification of alveolitis (n=10); BE = Before extraction; AE = After extraction; AA = After alveolitis. * = $p < 0.05$, comparing N and UN to AA after 28 days of alveolitis.

4.2 SEGUNDO ARTIGO ORIGINAL

O segundo artigo original deste estudo foi intitulado: “**Dental alveolitis and alveolar healing in rats submitted to neonatal malnutrition**”. Este artigo foi submetido como artigo original a Research in Veterinary Science, que é classificada pela CAPES como qualis B1 para área de medicina II (ANEXO C).

Neste artigo realizou-se a quantificação dos níveis de osteocalcina e cálcio iônico em ratos adultos, submetidos à desnutrição neonatal e alveolite dentária e relacionou-os com o estágio de cicatrização alveolar. Houve redução da osteocalcina no grupo N-28 e aumento no grupo DN-28; a disponibilidade do cálcio iônico foi maior nos animais nutridos e o processo de cicatrização alveolar apresentou um maior desenvolvimento nos animais nutridos. Deste modo, esta pesquisa comprovou a influência da desnutrição neonatal associada à alveolite dentária, tanto no que se refere às alterações dos níveis de osteocalcina e cálcio iônico, quanto no retardo do processo de cicatrização alveolar.

Dental alveolitis and alveolar healing in rats submitted to neonatal malnutrition

Flávia Regina Gonçalves de Araújo^{1,2 *}, Célia Maria Machado Barbosa de Castro^{1,2,3}, Judith Advíncula Rocha¹, Bruno Sampaio¹, Chefas Silva Guedes¹, Liriane Baratella Evêncio⁴, Luciano Tavares Montenegro⁵

¹*Microbiology Division, Laboratory of Immunopathology Keizo-Asami, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil*

²*Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil*

³*Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil*

⁴*Department of Histology, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil*

⁵*Department of Pathology, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil*

* Corresponding author: Flávia Regina Gonçalves de Araújo, Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA-UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil. Phone: +55 81 21268484, Fax: +55 81 21268485. E-mail: flavia_regina_@hotmail.com

Abstract

The aim of this study was to compare the levels of osteocalcin and ionized calcium with the alveolar healing process in rats undernourished and suffering from dental alveolitis. Forty rats were used, divided randomly into four groups: N-21, UN-21, N-28 and UN-28. After 90 days, the animals underwent extraction and induction of alveolitis. After 21 or 28 days of alveolitis the levels of osteocalcin and ionized calcium were determined and, in addition, the dental alveolus was completely removed. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The t test was used for parametric data and the Mann-Whitney test for nonparametric data. Statistical significance was set at 5%. Osteocalcin levels decreased in group N-28 and increased in group UN-28; the availability of ionized calcium was higher in the nourished animals and the alveolar healing process showed a greater development in the nourished animals.

Keywords: Osteocalcin; Ionized calcium; Alveolar healing; Neonatal malnutrition; Dental alveolitis

Introduction

Despite the technical and scientific advances in the field of dentistry, particularly in relation to dental procedures, in which it is possible to employ preventive and curative therapeutic measures that allow us to maintain the tooth in the oral cavity, we note that it is still quite common to come across situations in which tooth extraction is the most appropriate treatment option.

It is important to emphasize that this less conservative management often involves the poorer and more undernourished segment of the population because their socioeconomic status does not allow them adequate food intake (Shahar et al., 2005), oral hygiene practices, or the use of therapeutic resources to prevent the loss of their teeth, because they are treated mostly in public health services that lack sufficient resources to perform atraumatic surgical techniques complying with the principles of an aseptic chain (Adeyemo, 2004). Thus, these patients often suffer considerable postoperative pain and can even develop a severe condition known as alveolitis (Nusair e Younis, 2007; Resende, 2009).

Energy and protein are essential for the healing process to proceed in the best possible way, regardless of whether it is due to a trauma, fracture or postoperative sequela (Neumann et al., 2004). Silva et al. (2004) and Aguilar-Nascimento (2010) stated that, when the patient has a good nutritional status and diet with adequate levels of protein, healing usually follows the conventional patterns. Thus, after extraction of a tooth, a blood clot is formed at the site and its final organization is effected by a reaction of granulation, which is gradually replaced by a coarse fibrillar bone, and eventually by mature bone. However, owing to quantitative and/or qualitative nutritional deficiencies, the healing process may not comply with these principles, becoming slower, thereby facilitating premature necrosis of the clot or its detachment from the alveolar walls, which are exposed to the oral environment. These two

situations favor the onset of alveolitis (Torres-Lagares et al., 2006; Kreuger et al., 2007; Bortoluzzi et al., 2008).

According to Monteiro (2003), malnutrition takes on major proportions in Brazil and is present in all regions and areas, although the population most affected lives in the North and Northeast. The author in question argues that undernourished individuals manifest clinical signs of an inadequate quantity (energy) or quality (nutrients) from the diet or as a result of diseases that cause poor biological utilization of the food ingested. With regard to malnutrition, Chandra (1997) noted that it is a major cause of secondary disability in the response of the organism to infectious agents, even favoring the progression of a localized infection to a systemic one.

Watts (1999) reported that there was a breakthrough in the development of noninvasive techniques to evaluate the formation of bone matrix, because they make it possible to measure its components as they enter the circulation during bone formation. In view of this, Saraiva and Lazaretti-Castro (2002), Guarniero et al. (2003) and Cardoso et al. (2007) advocated the quantification of osteocalcin as a good parameter for evaluating bone tissue repair as it is a specific biochemical marker of bone formation.

Calcium is an important mineral for various metabolic activities, in particular bone metabolism. Its presence permits the formation and maintenance of bone mineral density (PAIXÃO; BRESSAN, 2010).

Marzola (1994) stated that under normal conditions, alveolar healing in humans takes approximately 64 days. Cardaropoli et al. (2003) showed that in dogs it decreases to 48 days, while Brandão et al. (2002) and Elsubeihi and Heersche (2004) concluded that in rats this process is completed in 21 days.

Poi et al. (2000) and Araújo (2006) demonstrated that alveolitis slows the alveolar healing process because the alveoli belonging to the group of rats with this disease (control group) exhibited only a slight bone formation at the level of the middle and apical thirds.

The present study quantified the levels of osteocalcin and ionized calcium in adult rats submitted to neonatal malnutrition and dental alveolitis and related them to the stage of alveolar healing. The study of these aspects in animals is important from the experimental and clinical standpoints, due to nutritional aggression during the neonatal period. This represents a stage of great vulnerability as various organic systems are in the process of formation, particularly the defense of the host against infection.

Materials and methods

Ethical Considerations

This research was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Center for Biological Sciences of the Federal University of Pernambuco (protocol number 008283/2007 - 34).

Animals

A total of 40 albino male Wistar rats from the breeding colony of the Department of Nutrition of the Federal University of Pernambuco were used. These animals were kept in a bioterium at a temperature of $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ in a light/dark cycle of 12 hours (light - 6 to 18h; dark - 18 to 6h).

- Nutritional manipulation

After birth, the male pups were kept with their mothers in groups of six as this number helps to maintain the nutritional pattern (Committee on Laboratory Animal Diets, 1979).

Thus, when necessary, we carried out a reduction or complementation of the offspring through a random selection of male pups. It is noteworthy that in the case of complementation, this was conducted using other litters of the same age. Then, on the basis of the dietary regimen employed, we obtained the following groups, each of which comprised 20 animals:

Nourished (N): pups whose mothers were fed with 17% casein during the period of lactation.

Undernourished (UN): suckled rats whose mothers were fed through a nutritionally deficient diet, 8% casein, during lactation.

After weaning, the mothers of both groups were euthanized.

- Somatic growth

The nourished and malnourished animals were breastfed until the 21st day after birth, corresponding to the lactation period (Harkness, 1993). During this period a daily record was kept (digital electronic weighing scale – Marte, model S-4000-with a sensitivity of 0.1 g) of the body weight of each animal to monitor weight during nutritional manipulation. From the 22nd day of life, the animals were separated from their mothers, kept in collective cages containing three animals each and fed *ad libitum* water and the standard diet of the bioterium (Labina – Purina Brazil S/A), containing 23 % mixed protein until the end of the experiment. Their body weights were measured once a week, thus allowing their nutritional recovery to be monitored.

- Induction process of alveolitis

After 90 days all 40 animals (nourished and undernourished) were submitted to the alveolitis process.

To implement this step, the animals were anesthetized with ketamine hydrochloride (10 mg/kg) + xylazine hydrochloride (0.5 mg/kg), associated in the same syringe and

administered intramuscularly. Next, the upper right incisor was extracted, using the technique proposed by Okamoto & Russo (1973), in which the instruments used were similar to those employed in the extraction of primary teeth. After extraction, an alveolar ischemia was induced by the insertion of a small sterile cotton pad soaked in 1:1000 adrenaline for 15 minutes. Following the removal of this cotton, the animals remained under observation for 15 minutes in order to verify the absence of blood clot formation inside the alveolus, and after 48 hours, the animals were examined clinically by separating the lips, which allowed us to observe the development of the alveolitis by the presence of local edema, hyperemia, abscess formation, purulent secretion and fetid odor (Poi et al., 2000; Araújo, 2006; Araújo et al., 2009).

Previous research has reported that the normal alveolar healing process in rats occurs approximately 21 days after extraction (Brandão et al., 2002; Elsubeihi and Heersche, 2004). However, another study showed that the alveolitis was able to slow the alveolar healing process because, on the 28th postoperative day, the alveolus with this disorder exhibited a mild osteogenesis (Poi et al., 2000).

From the time of extraction to the day of euthanasia, the animals were kept separately in individual polypropylene cages covered with zinc wire, following which both the **Nourished (N)** and **Undernourished (UN)** rats were randomly separated into the following groups:

- a) Group N-21 – nourished animals that were euthanized on the 21st day after the clinical verification of alveolitis;
- b) Group UN-21 – undernourished animals that were euthanized on the 21st day after the clinical verification of alveolitis;
- c) Group N-28 – nourished animals that were euthanized on the 28th day after the clinical verification of alveolitis;

d) Group UN-28 – undernourished animals that were euthanized on the 28th day after the clinical verification of alveolitis.

It should be emphasized that each group comprised 10 animals.

Quantification of the Levels of Osteocalcin and Ionized Calcium

To perform the quantification of these levels 5 ml of blood was collected from each animal by cardiac puncture on the 21st day after the clinical verification of alveolitis for groups N-21 and UN-21 and on the 28th day after the clinical verification of alveolitis for groups N-28 and UN-28. The collected blood was transferred to eppendorf tubes, which were placed in a Sigma Laboratory 6-15 centrifuge at 4°C at a speed of 3000 rpm for 5 minutes. Then, with the aid of a micropipette of 100 µL, the serum was deposited into new eppendorf tubes and stored in a freezer at -20°C before being sent to the CIAC/ALVARO laboratories for the osteocalcin assays, using the chemiluminescence method, and the ionized calcium assays, using the calculated method.

Histological Processing

This procedure was performed on the 21st day after the clinical verification of alveolitis for groups N-21 and UN-21 and on the 28th day after the clinical verification of alveolitis for groups N-28 and UN-28. For the collection of the specimens, animals were euthanized by an overdose of the anesthetics used in the process of inducing the alveolitis. Next, the right maxilla was separated from the left using a mounted scalpel with a number 11 blade and with the aid of blunt scissors a tangential cut was made on the distal surface of last molar, which enabled the entire alveolus to be studied (Araújo, 2006). After that the animals were sent to the UFPE's biological waste disposal unit.

Subsequently, the specimens were fixed in a 10% formaldehyde solution for 24 hours, washed in running water and decalcified in a solution of sodium citrate and formic acid in equal parts for 35 days (Morse, 1945; Poi et al., 2000). Decalcification was verified mechanically by inserting a thin needle. The specimens were then dehydrated in increasing concentrations of ethanol, cleansed in xylene and embedded in paraffin histology, so that their orientation would allow longitudinal cuts to be made in the alveoli. Semi-serial sections with a thickness of approximately 6µm were obtained through the technique employed by Tolosa (2003), and these were stained with hematoxylin-eosin, mounted in Entellan, observed and photomicrographed under an Olympus BX-50 microscope.

Histological Analysis

To describe the histological findings, the dental socket was divided into three thirds - apical, middle and cervical (Araújo, 2006). In each of these, the stage of healing was microscopically analyzed by means of the Motic Image Plus program. This allowed the measurement in micrometers of the following histological structures: bone tissue, connective tissue, blood clot and inflammatory tissue.

Statistical Analysis

The data were analyzed by a statistician using the "Jandel SigmaStat Statistical Software." Descriptive statistics were performed using the mean and standard deviation. The p value was obtained using the t test for parametric data and the Mann-Whitney test for nonparametric data. Statistical significance was considered assuming a critical level of 5% in all cases.

Results

The dosage of osteocalcin obtained in serum from animals of the groups N-21, UN-21, N-28 and UN-28 is shown in Figure 1. When comparing the groups N-21 x UN-21, there was no difference between them; however, with regard to groups N-28 x UN-28 a difference could be observed as there was a reduction in osteocalcin in group N-28 and an increase in group UN-28 ($p < 0.05$). Regarding the comparison between 21 and 28 days after clinical verification of alveolitis, a smaller amount of osteocalcin was found in the nourished animals ($p < 0.05$), as opposed to an increase in the undernourished ones ($p < 0.05$).

The dosage of ionized calcium present in the serum of animals in groups N-21, UN-21, N-28 and UN-28 is shown in Figure 2. When comparing the groups N-21 x UN-21 and N-28 x UN-28, a greater amount of ionized calcium was present in the nourished animals ($p < 0.05$). Comparing the periods of 21 and 28 days after the clinical verification of alveolitis, a higher concentration of ionized calcium was observed in the nourished animals ($p < 0.05$), whereas in the undernourished ones no difference was found between these periods.

The histological analysis identified the following characteristics:

In group N-21, the apical and middle thirds were filled with large amounts of bone tissue surrounding small pieces of connective tissue (Figure 3 – A and B). In the cervical third, the ossification process was similar to the other thirds, but it was possible to observe a greater area of connective tissue in its central portion (Figure 3 – C). This is due to the fact that the cervical third is larger than the apical and middle thirds.

In group UN-21, the inflammatory tissue was present in all portions of the tooth socket. The amount of connective tissue found in the three alveolar thirds was larger than that of bone tissue. This was evident only at the ends of the alveolus or as small trabeculae at its center (Figure 4 – A, B and C). In the middle third the degeneration of the blood clot was also

observed (Figure 4 – B) and in the cervical third an extensive area of purulent secretion together with inflammatory tissue was detected (Figure 4 – C).

In group N-28, the tooth socket was filled with bone tissue in almost its entire length (Figure 5 – A, B and C). In the apical third it was still possible to see small areas of connective tissue (Figure 5 – A). In the middle third the alveolus was found to be completely obliterated (Figure 5 – B). In the cervical third, due to its great length, the connective tissue was still observed in some regions of the alveolus, and the newly-formed bone tissue was present in its central portion (Figure 5 – C).

In group UN-28, the inflammatory tissue was found in all the alveolar thirds (Figure 6 – A, B and C). However, in the cervical third there was also a large amount of purulent secretion (Figure 6 – C). In the three alveolar portions the new bone formation was found to be thinner and concentrated at the extremities (Figure 6 – A, B and C). The connective tissue was observed in a large part of the apical and middle thirds, and the apical third exhibited a greater number of blood vessels (Figure 6 – A), while in the middle third remnants of a blood clot were visualized (Figure 6 – B).

The bone tissue, connective tissue, blood clot and inflammatory tissue evidenced in the alveolar apical third of the animals belonging to groups N-21, UN-21, N-28 and UN-28 are presented in Figure 7. A comparison between groups N-21 x UN-21 and N-28 x UN-28 revealed a larger amount of bone tissue in the nourished animals ($p < 0.05$); however, connective tissue and blood clot were less frequent findings in these animals ($p < 0.05$), while inflammatory tissue was seen only in the undernourished animals ($p < 0.05$). Comparing the periods of 21 and 28 days after the clinical verification of alveolitis, a greater formation of bone tissue was observed in both the nourished animals and the undernourished ones ($p < 0.05$). Furthermore, in the nourished animals there was less formation of connective tissue ($p < 0.05$).

The bone tissue, connective tissue, blood clot and inflammatory tissue observed in the alveolar middle third in all animals in groups N-21, UN-21, N-28 and UN-28 are shown in Figure 8. When groups N-21 x UN-21 and N-28 x UN-28 were compared, a greater formation of bone tissue associated with a lower amount of connective tissue was found in the nourished animals ($p<0.05$). Nonetheless, it is noteworthy that in the nourished animals the blood clot and the inflammatory tissue were absent ($p<0.05$). As for the comparison between 21 and 28 days after the clinical verification of alveolitis, a greater bone tissue formation and a decrease in connective tissue development were observed in the nourished animals ($p<0.05$).

The bone tissue, connective tissue, blood clot and inflammatory tissue found in the alveolar cervical third of the animals from groups N-21, UN-21, N-28 and UN-28 are presented in Figure 9. The comparison between groups N-21 x UN-21 and N-28 x UN-28 showed a greater development of bone tissue in the nourished animals ($p<0.05$), while a lower amount of connective tissue and fewer blood clots were observed in these animals ($p<0.05$). Furthermore, the inflammatory tissue was found only in undernourished animals ($p<0.05$). Given the comparison between 21 and 28 days after the clinical verification of alveolitis, a greater bone tissue formation associated with a reduction in connective tissue and blood clot was obtained in the nourished animals ($p<0.05$). As regards inflammatory tissue, there was a significant increase in the undernourished animals ($p<0.05$).

Discussion and Conclusions

Menezes Júnior et al. (2009) reported that a diminished blood supply impairs the healing of any wound and facilitates the onset of an infectious process. This was demonstrated during the course of this study: after the extraction of the rats' upper right incisor, an alveolar ischemia was induced by the insertion of a small sterile cotton pad soaked in 1:1000

adrenaline for 15 minutes. After its removal no blood clot formation was seen inside the alveolus; after 48 hours, however, the development of dental alveolitis was observed in all animals.

Fioretto et al. (2002) performed a study in rats, in which protein-caloric malnutrition was induced during the suckling period and its effects were evaluated in adulthood, with regard both to structural changes undergone by the heart and to the dysfunction developed by the myocardium. Similarly, this experiment showed the effects of neonatal malnutrition suffered by adult rats, taking into account the changes in the levels of osteocalcin and ionized calcium and the delay in the alveolar healing process.

In animals, the markers of bone metabolism have been used in studies involving bone biology (Allen et al., 1998), skeletal neoplasia (Garzotto et al., 2000), osteoarthritis (Fox and Cook, 2001), fracture healing (Francis and Millis, 2002), and the effects of diets and drugs (Allen, 2003). However, no report was found in the literature on the use of these markers during the development of alveolar repair. Quantification of the osteocalcin levels in the nourished and undernourished rats submitted to the extraction and process of dental alveolitis was therefore of great importance because it allowed its effectiveness during osteogenesis to be demonstrated.

According to Cardoso et al. (2007), the markers of bone formation and resorption in animals require further studies comparing the values of their concentrations and the results of histomorphometry, thereby demonstrating their sensitivity and specificity. Based on these reports, we performed a correlation between the values of the osteocalcin levels obtained from the serum of the nourished and undernourished animals after the alveolitis and those of new bone formation observed in the dental alveoli. This correlation demonstrated the effectiveness of osteocalcin as a good marker of bone formation.

Castillo et al. (1999) reported that for the study of bone metabolism the dosages of osteocalcin, specific to bone tissue or total serum alkaline phosphatase, including alkaline phosphatase - bone fraction, may be used, the latter being more related to the formation of hydroxyapatite crystals. These same authors also observed that the concentration of osteocalcin was increased in cases of metabolic bone disease, owing to the need for greater bone tissue formation to compensate for the bone loss, and were able to verify the normalization of its concentration following the therapeutic measures taken. In our study, after 21 days of verification of alveolitis, the osteocalcin showed elevated levels in the nourished and undernourished groups with the aim of promoting osteogenesis; however, after 28 days of verification of alveolitis, the level of osteocalcin had decreased in the nourished group because the tooth socket was filled with bone tissue in almost its entire length, whereas in the undernourished group its level remained high, probably in an attempt to recover osteogenic activity.

Saraiva and Lazaretti-Castro (2002) demonstrated that the bone formation markers had lower values as a result of the restoration of bone mass. This was also evidenced in our experiment, for a decrease of the amount of osteocalcin in group N-28 was associated with the progression of alveolar bone repair.

Dickerson et al. (2004), Inzucchi (2004) and Vieira (2007) reported that serum calcium circulates in two main forms: ionized calcium (which exerts the biological action) and complexed and protein-bound calcium. It is evident that any change in the level of serum proteins, particularly albumin, leads to a change in the total content of calcium in the serum, but without this signifying a change in the ionized fraction. In view of this, in a series of clinical conditions, an assay of total calcium does not provide full reliable information on functional calcemia, which is why we chose to assay the ionized calcium.

According to Cardoso et al. (2007), Vieira (2007), Calvi and Bushinsky (2008) and Costa et al. (2008), ionized calcium is the most important physiological component of total calcium. Thus, strategies designed to measure it through the direct method (ion-selective electrodes) or the estimation method (calculated), have been widely used. However, these methods have their advantages and disadvantages. For example, with the direct method, the result is obtained quickly, since the assaying of the sample has to be immediate. However, it is necessary to avoid loss of CO₂, control the pH and invest substantial financial resources. As for the calculated method, the levels of serum proteins need to be adjusted, especially that of albumin. However, the assay does not need to be done within 2 or 3 hours of the collection, thereby allowing the freezing and processing of the samples to be carried out later, with no risk of their becoming degraded. In view of this, the calculated method was used in our experiment to assay the ionized calcium because, after obtaining the sera, they were frozen and processed at a later stage.

Several studies have shown that the alveolar healing process, regardless of the animal species, consists of the following events: blood clot resorption, connective tissue proliferation resulting in the appearance of a granulomatous tissue reaction, and development of immature bone tissue with its subsequent mineralization (Kanyama et al., 2003; Magro Érnica et al., 2003; Araújo and Lindhe, 2005). In agreement with these authors, we found that, despite the presence of alveolitis, the events described during the process of alveolar healing occurred in all the groups in the present study, but at different speeds.

The presence of remaining connective tissue of the periodontal ligament is essential for the alveolar healing process to take place (Lin et al., 1994; Polimeni et al., 2004). Collagen fibers and fibroblasts are elements that favor the occurrence of this phenomenon concentrically, that is from the buccal/palatal walls to the center of the alveolus and from the apical third to the cervical third (Devlin et al., 1997; Calixto et al., 2001). The histological

findings in this study are consistent with these reports. However, it is important to emphasize that despite the fact that the statistical analysis showed a greater amount of bone tissue in the cervical third, it was observed during the analysis of the histological preparations that the middle third exhibited the highest degree of bone repair, followed by the apical and lastly, the cervical third. This can be explained by the fact that the middle third is narrower, with its new bone formation occurring from the buccal/palatal walls to the center of the alveolus, thus promoting a greater bone sealing. The apical third came next, being slightly wider than the middle third; however, in this third it was possible to observe, in addition to the direction of the bone formation mentioned above, another direction exists extending from the apical region to the cervical region. Finally, the cervical third, being larger than the other two, allowed a greater spacing between the newly-formed bone trabeculae, thereby producing less bone repair, despite the existence of a greater amount of bone tissue.

Brandão et al. (2002) and Elsubeihi and Heersche (2004) have stated that, under normal conditions, alveolar healing in rats takes approximately 21 days. According to Yücel et al. (2003), Pereira et al. (2006) and Silva et al. (2007), the mechanisms of wound healing of tooth extraction are related to processes of an endogenous and exogenous, systemic or local nature, which may speed or delay the process. Thus, in this study, groups N-21 and N-28 showed a slight delay in alveolar healing. This delay was also observed by Poi et al. (2000) and Araújo (2006) in their experiments when they found that in the alveoli of rats with alveolitis the osteogenesis was slower than in the uninfected alveoli. With respect to groups UN-21 and UN-28, the difficulty in achieving alveolar repair was much more marked since, in addition to the disease, the animals in these groups had malnutrition. According to Junqueira and Carneiro (1999), the deposition of calcium, collagen synthesis and the proliferation of vital osteogenic cells for bone repair all require a large amount of protein

synthesis and in these animals this occurred slowly, due to the malnutrition suffered in the neonatal period.

Cardaropoli et al. (2003) concluded from their research that the proximity of the cervical third to the oral cavity may account for the greater development of inflammatory tissue, owing to the large amount of bacteria in this area. An imbalance between these bacteria and the host favors the onset of inflammatory and/or infectious processes (Tortora et al., 2000; Ye et al., 2003), which are harmful in that they damage cells and structures surrounding the connective tissue and can even affect the alveolar bone (Querido et al., 2004). These reports are consistent with the results of this experiment, since the cervical third was the one in which the greatest formation of inflammatory tissue occurred. However, it must be emphasized that this was evident only in the undernourished animals, with group UN-28 being the one most affected.

Moraes et al. (1999) showed through experiments in mice that their incisors were arranged symmetrically on both sides of the midline in the maxilla. This histological finding was also observed by Araújo (2006) in rats, who added that, in addition to the upper incisors presenting a symmetrical arrangement, they could be positioned in a parallel or divergent manner in relation to each other. These statements were evidenced in this study, so that, in describing the histological findings, it was decided to divide the tooth socket into three thirds - apical, middle and cervical, for, in view of what was elucidated, it was possible to display the three thirds on a single slide during the histological analysis (parallel alveoli), while in others, each third was examined on a different slide (divergent alveoli).

In conclusion, on the basis of the results of this study and a review of the literature, it was possible to demonstrate the importance of this study for the area of dentistry, because it illustrated the influence of neonatal malnutrition associated with dental alveolitis, both with

regard to the changes in the levels of osteocalcin and ionized calcium, and to the delay in the process of alveolar healing.

Acknowledgements

This research was supported by LIKA-UFPE (Laboratory of Immunopathology Keizo-Asami, Federal University of Pernambuco) and CAPES (Coordination of Further Training of Higher Education Personnel).

The survey was designed by F. R. G. de A. e C. M. M. B. de C. All the authors contributed to the collection and interpretation of the data, as well to the drafting of the manuscript.

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Adeyemo, W.L., 2004. Etiology of dry socket: additional factors. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 62, 519-520.
- Aguilar-Nascimento, J.E., 2010. Como otimizar o preparo pré-operatório com terapia nutricional. *Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral* 12, 2-5.
- Allen, M.J., Hoffmann, W.E., Breur, G.J., Richardson, D.C., 1998. Serum markers of bone metabolism in dogs. *Research Veterinary Science* 59, 250-254.
- Allen, M.J., 2003. Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Veterinary Clinical Pathology* 32, 101-113.
- Araújo, F.R.G.de, 2006. Resposta bacteriológica e histológica em processo de alveolite em ratos (*Rattus norvegicus albinus*) tratados com *Mercurius solubilis*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

- Araújo, F.R.G.de, Castro, C.M.M.B., Severo, M.S., Diniz, M.F.A., Viana, M.T., Evêncio, L.B., 2009. Effect of *Mercurius solubilis* on the bacteriological response in the alveolitis process in rats. *Homeopathy* 98, 160-164.
- Araújo, M.G., Lindhe, J., 2005. Dimensional ridge alterations following tooth extraction: an experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology* 32, 212-219.
- Bortoluzzi, M.C., Manfro, R., Poggere, V., Silva, R.D., 2008. Incidence of fibrinolytic alveolitis, acute infection, edema, and pain longer than two days after dental extraction. *Revista Odonto Ciência* 23, 111-114.
- Brandão, A.C., Brentegani, L.G., Novaes Júnior, A.B., Grisi, M.F.M., Souza, S.L.S.de, Taba Júnior, M., Salata, L.A., 2002. Histomorphometric analysis of rat alveolar wound healing with hydroxyapatite alone or associated to BMPs. *Brazilian Dental Journal* 13, 147-154.
- Calixto, R.F.E., Teófilo, J.M., Brentegani, L.G., Lamano Carvalho, T.L., 2001. Implante de um floculado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. *Pesquisa Odontológica Brasileira* 15, 257-262.
- Calvi, L.M., Bushinsky, D.A., 2008. When is it appropriate to order an ionized calcium? *Journal of the American Society of Nephrology* 19, 1257-1260.
- Cardaropoli, G., Araújo, M., Lindhe, J., 2003. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites: an experimental study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology* 30, 809-817.
- Cardoso, M.J.L., Muniz, L.M.R., Gasparini, T.J., Melussi, M., 2007. Homeostase do cálcio e marcadores do metabolismo ósseo no hipertireoidismo felino – revisão. *Archives of Veterinary Science* 12, 17-27.
- Castillo, V., Lalia, J., Rodríguez, M., Casas, G., Márquez, A., 1999. Osteocalcin: a biochemical marker for osteogenesis and metabolic osteopathology during the growth period in dog of large breeds. *Revista Científica, FCV-LUZ* 9, 138-142.

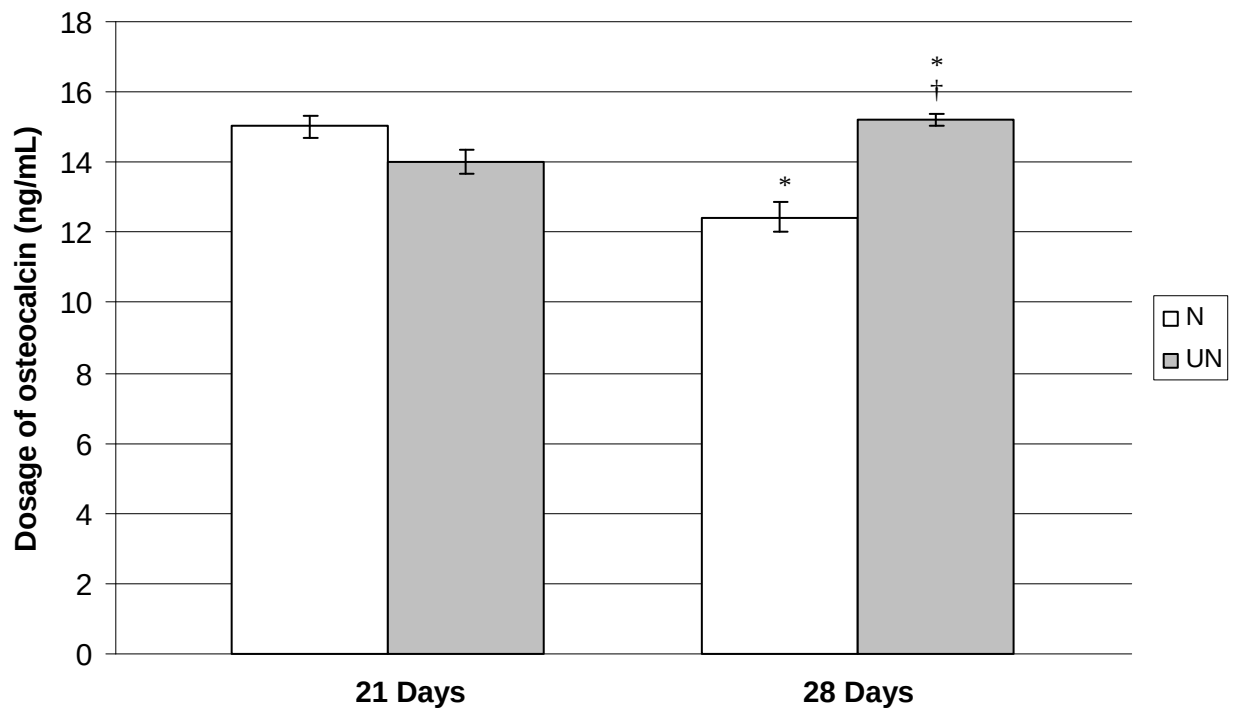
- Chandra, R.K., 1997. Nutrition and the immune system: an introduction. *American Journal of Clinical Nutrition* 66, 460-463.
- Commitee on Laboratory Animal Diets, 1979. Assembly of life sciences. National Research Council. Control of diet in laboratory animal experimentation. *Nutrition Abstracts and Reviews* 40, 413-419.
- Costa, M.B., Lanna, C.M.M., Braga, M.H., Magalhães, S., 2008. Avaliação da hipercalcemia assintomática em pacientes ambulatoriais. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 44, 329-335.
- Devlin, H., Hoyland, J., Newall, J.F., Ayad, S., 1997. Trabecular bone formation in the healing of the rodent molar tooth extraction socket. *Journal of Bone and Mineral Research* 12, 2061-2067.
- Dickerson, R.N., Alexander, K.H., Minard, G., Croce, M.A., Brown, R.O., 2004. Accuracy of methods to estimate ionized and “corrected” serum calcium concentrations in critically ill multiple trauma patients receiving specialized nutrition support. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 28, 133-141.
- Elsubeihi, E.S., Heersche, J.N.M., 2004. Quantitative assessment of post-extraction healing and alveolar ridge remodelling of the mandible in female rats. *Archives of Oral Biology* 49, 401-412.
- Fioretto, J.R., Querioz, S.S., Padovani, C.R., Matsubara, L.S., Okoshi, K., Matsubara, B.B., 2002. Ventricular remodeling and diastolic myocardial dysfunction in rats submitted to protein-calorie malnutrition. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* 282, 1327-1333.
- Fox, D.B., Cook, J.L., 2001. Synovial fluid markers of osteoarthritis in dogs. *Journal American Veterinary Medical Association* 219, 756-761.

- Francis, D.A., Millis, D.L., 2002. Trends observed in bone metabolism markers from dogs following radial ostectomy. *Veterinary Compendium Orthopaedics Traumatology* 2, A5.
- Garzotto, C.K., Berg, J., Hoffmann, W.E., Rand, W.M., 2000. Prognostic significance of serum alkaline phosphatase activity in canine appendicular osteosarcoma. *Journal Veterinary Internal Medicine* 14, 587-592.
- Guarniero, R., Cinagava, M.Y., Santana, P.J.de, Batista, M.A., Oliveira, L.A.A.de, Rodrigues, C.J., Cinagava, F.T., 2003. Influência do componente protéico na consolidação de fraturas: trabalho experimental em ratos. *Acta Ortopédica Brasileira* 11, 206-210.
- Harkness, J.E., 1993. Biologia e manejo. In: Harkness, J.E. (Ed.), *Biologia Clínica de Coelhos e Roedores*. Roca, São Paulo, pp. 9-55.
- Inzucchi, S.E., 2004. Management of hypercalcemia. Diagnostic workup, therapeutic options for hyperparathyroidism and other common causes. *Postgraduate Medicine* 115, 27-36.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., 1999. Tecido ósseo. In: Junqueira, L.C., Carneiro, J. (Eds.), *Histologia básica*, ninth ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 111-128.
- Kanyama, M., Kuboki, T., Akiyama, K., Nawachi, K., Miyauchi, F.M., Yatani, H., Kubota, S., Nakanishi, T., Takigawa, M., 2003. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. *Archives of Oral Biology* 48, 723-730.
- Kreuger, M.R.O., Ternes, C.E., Mello, L.L., Cruz, A.B., Leite, S.N., Tames, D.R., 2007. The influence of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* on the healing of infected dental alveoli: A histological study in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 17, 349-355.
- Lin, W.L., McCulloch, C.A., Cho, M.I., 1994. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *Anatomical Record* 240, 492-506.

- Magro Érnica, N., Magro Filho, O., Rangel Garcia, I., 2003. Histologic study of use of microfibrillar collagen hemostat in rat dental sockets. *Brazilian Dental Journal* 14, 12-15.
- Marzola, C., c1994. Processo de reparo alveolar. In: Marzola, C. (Ed.), *Técnica Exodôntica*, second ed. Pancast, São Paulo, pp. 303-326.
- Menezes Júnior, L.R., Gaujac, C., Trento, C.L., 2009. Influência das alterações locais sobre o processo de reparo alveolar. *Revista Saúde e Pesquisa* 2, 411-416.
- Monteiro, C.A., 2003. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. *Estudos Avançados* 17, 7-20.
- Moraes, P.B.de, Hetem, S., Saavedra Júnior, M.A., Cecanho, R., Ramalho, L.T.O., 1999. Desenvolvimento do germe dental do incisivo do camundongo após transplante homólogo ou autógeno. *Revista de Odontologia da UNESP* 28, 33-47.
- Morse, A., 1945. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. *Journal of Dental Research* 24, 143-153.
- Neumann, M., Friedmann, J., Roy, M.A., Jensen, G.L., 2004. Provision of high-protein supplement for patients recovering from hip fracture. *Nutrition* 20, 415-419.
- Nusair, Y.M., Younis, M.H.A., 2007. Prevalence, clinical picture, and risk factors of dry socket in a Jordanian Dental Teaching Center. *The Journal of Contemporary Dental Practice* 8, 53-63.
- Okamoto, T., Russo, M.C., 1973. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. *Revista da Faculdade de Odontologia de Araçatuba* 2, 153-163.
- Paixão, M.P.C.P., Bressan, J., 2010. Cálcio e Saúde Óssea: tratamento e prevenção. *Revista Saúde e Pesquisa* 3, 237-246.
- Pereira, M.L.L., Carvalho, J.F.C., Fernandes, M.H.R., Peres, F., 2006. Efeito da nicotina no processo de formação óssea alveolar: Estudo em culturas celulares de osso alveolar humano. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial* 47, 79-90.

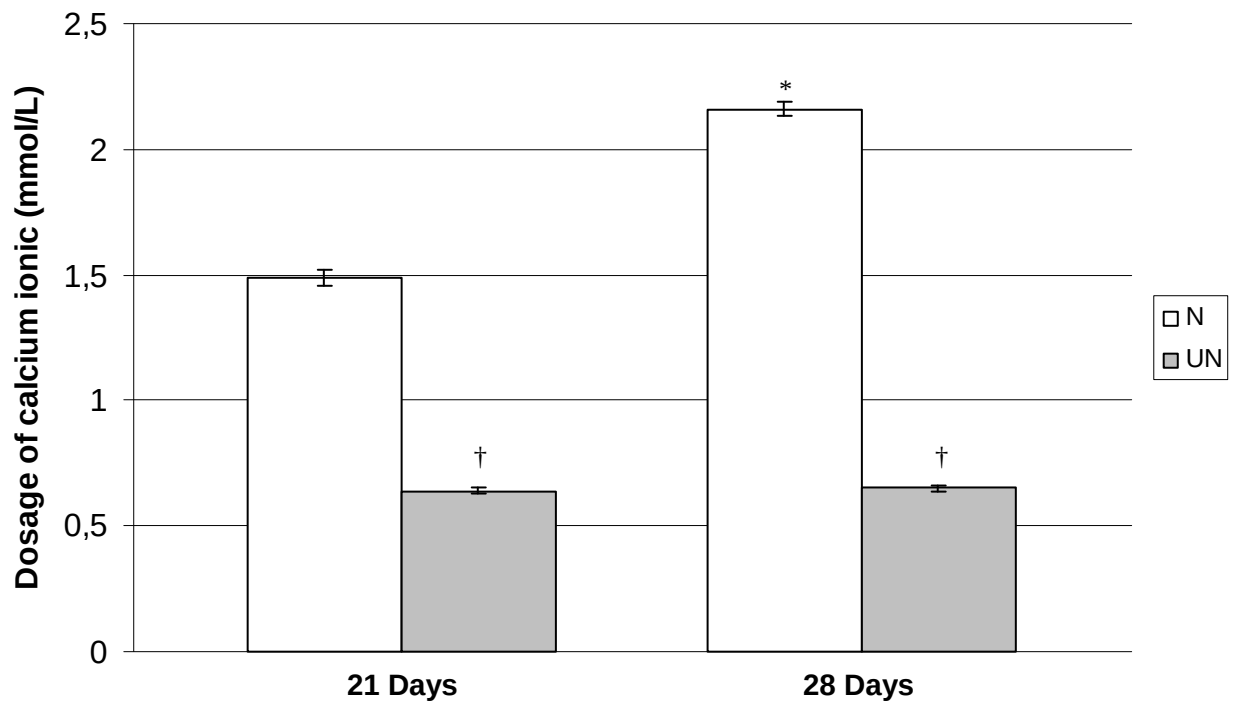
- Poi, W.R., Carvalho Júnior, J.A.R.de, Carvalho, P.S.P.de, Okamoto, T., 2000. Influência da pasta Sultan sobre o processo de reparo em alvéolo dental infectado. Análise histológica em ratos. *Revista Odontológica do Brasil Central* 9, 9-13.
- Polimeni, G., Albandar, J.M., Wikesjö, U.M.E., 2004. Prognostic factors for alveolar regeneration: osteogenic potential of resident bone. *Journal of Clinical Periodontology* 31, 840-844.
- Querido, S.M.R., Aquino, D.R., Cortelli, S.C., Cortelli, J.R., 2004. Avaliação clínica e microbiana da terapia periodontal mecânica em indivíduos com periodontite crônica. *Ciência Odontológica Brasileira* 7, 43-51.
- Resende, T.J.D.de, 2009. Alveolite: evidências científicas. Monografia, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal.
- Saraiva, G.L., Lazaretti-Castro, M., 2002. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 46, 72-78.
- Shahar, D., Shai, I., Vardi, H., Shahar, A., Fraser, D., 2005. Diet and eating habits in high and low socioeconomic groups. *Nutrition* 21, 559-566.
- Silva, C.C.da, Teixeira, A.S., Goldberg, T.B.L., 2004. Impacto da ingestão de cálcio sobre a mineralização óssea em adolescentes. *Revista de Nutrição* 17, 351-359.
- Silva, E.M.da, Gomes, S.P., Ulbrich, L.M., Giovanini, A.F., 2007. Avaliação histológica da laserterapia de baixa intensidade na cicatrização de tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo: estudo experimental em ratos. *Revista Sul-Brasileira de Odontologia* 4, 29-35.
- Tolosa, E.M.C.de, 2003. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica, second ed. Mande, São Paulo, pp. 11-331.

- Torres-Lagares, D., Infante-Cossio, P., Gutierrez-Perez, J.L., Romero-Ruiz, M.M., Garcia-Calderon, M., Serrera-Figallo, M.A., 2006. Intra-alveolar Chlorhexidine gel for the prevention of dry socket in mandibular third molar surgery. A pilot study. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugía Bucal* 11, 179-184.
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., 2000. Princípios de doença e epidemiologia. In: Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (Eds.), *Microbiologia*, sixth ed. Artes Médicas Sul, Porto Alegre, pp. 394-420.
- Vieira, J.G.H., 2007. Diagnóstico laboratorial e monitoramento das doenças osteometabólicas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 43, 75-82.
- Watts, N.B., 1999. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clinical Chemistry* 45, 1359-1368.
- Ye, P., Harty, D.W.S., Chapple, C.C., Nadkarni, M.A., Carlo, A.A.D.E., Hunter, N., 2003. *Streptococci* and *Actinomyces* induce antibodies which cross react with epithelial antigens in periodontitis. *Clinical and Experimental Immunology* 131, 468-476.
- Yücel, E.A., Oral, O., Olgaç, V., Oral, C.K., 2003. Effects of fibrin glue on wound healing in oral cavity. *Journal of Dentistry* 31, 569-575.



N = Nourished; UN = Undernourished. † = $p < 0.05$, comparing N and UN after 28 days of alveolitis.
 * = $p < 0.05$, comparing 21 and 28 days to N and UN. N-21(n=10); UN-21(n=10); N-28(n=10); UN-28(n=10).

Figure 1 – Dosage of osteocalcin found in the sera of the animals of groups N-21, UN-21, N-28 and UN-28.



N = Nourished; UN = Undernourished. † = $p < 0.05$, comparing N and UN after 21 and 28 days of alveolitis. * = $p < 0.05$, comparing 21 and 28 days to N. N-21(n=10); UN-21(n=10); N-28(n=10); UN-28(n=10).

Figure 2 – Dosage of calcium ionic found in the sera of the animals of groups N-21, UN-21, N-28 and UN-28.

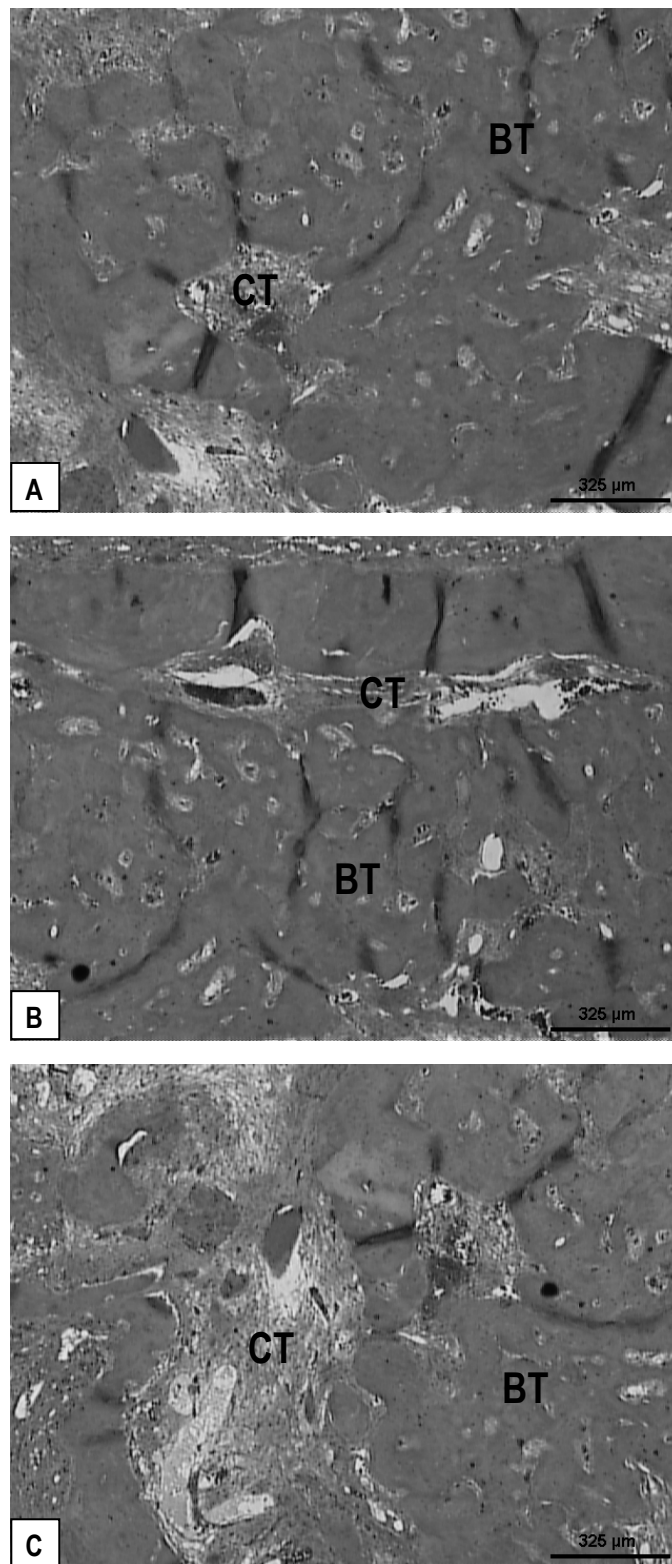


Figure 3 – Photomicrographs of alveolar portions of the upper right incisor of rats belonging to group N-21. In **A**) apical third; **B**) middle third; **C**) cervical third. Observe: **BT** – bone tissue; **CT** –connective tissue. Staining: HE.

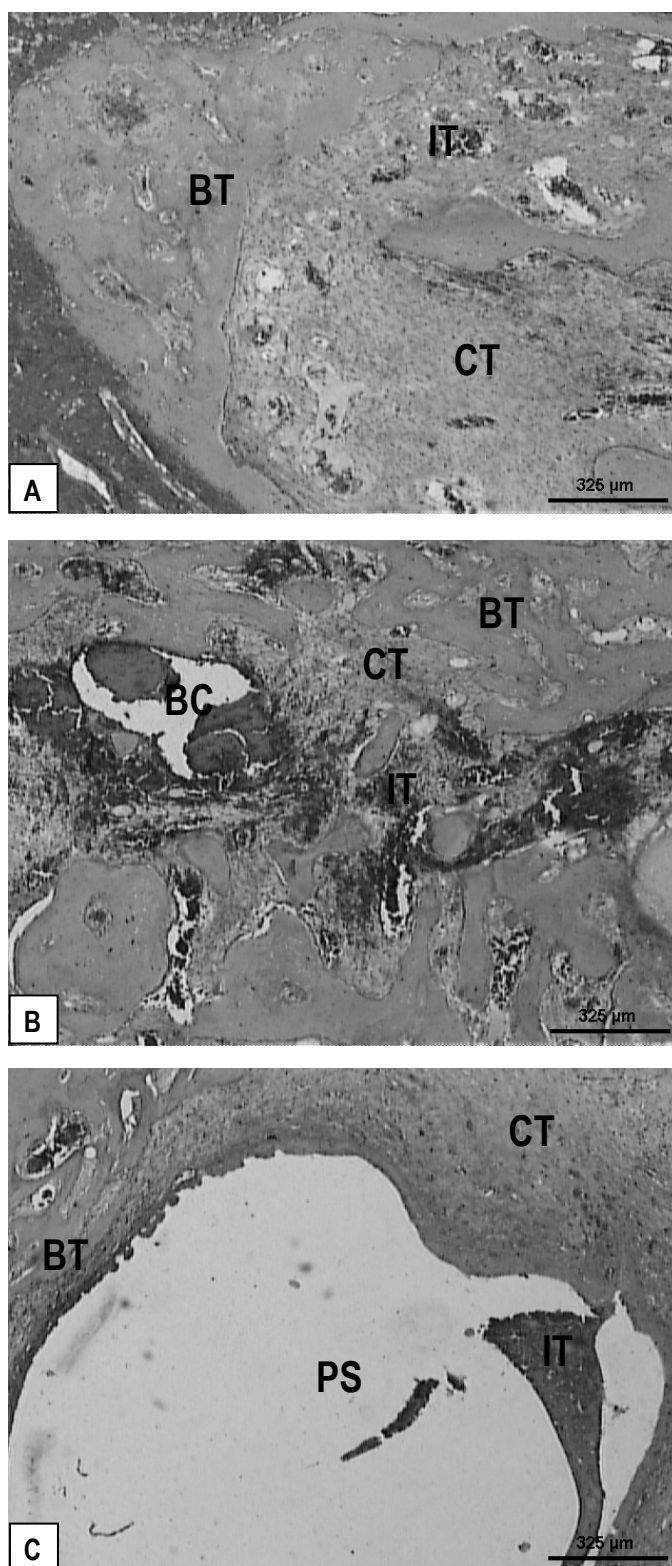


Figure 4 – Photomicrographs of alveolar portions of the upper right incisor of rats belonging to group UN-21. In **A)** apical third; **B)** middle third; **C)** cervical third. Observe: **BC** – blood clot; **IT** – inflammatory tissue; **BT** – bone tissue; **PS** – purulent secretion; **CT** – connective tissue. Staining: HE.

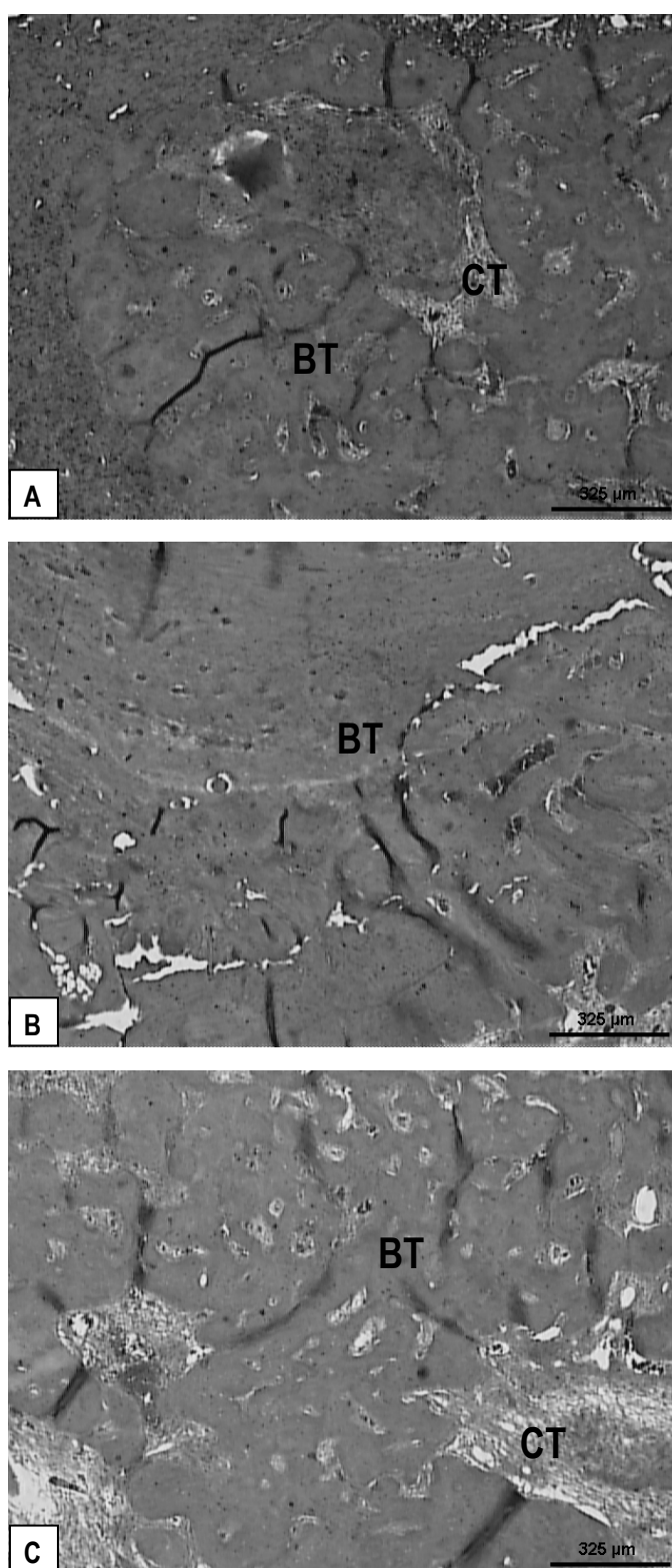


Figure 5 – Photomicrographs of alveolar portions of the upper right incisor of rats belonging to group N-28. In **A**) apical third; **B**) middle third; **C**) cervical third. Observe: **BT** – bone tissue; **CT** –connective tissue. Staining: HE.

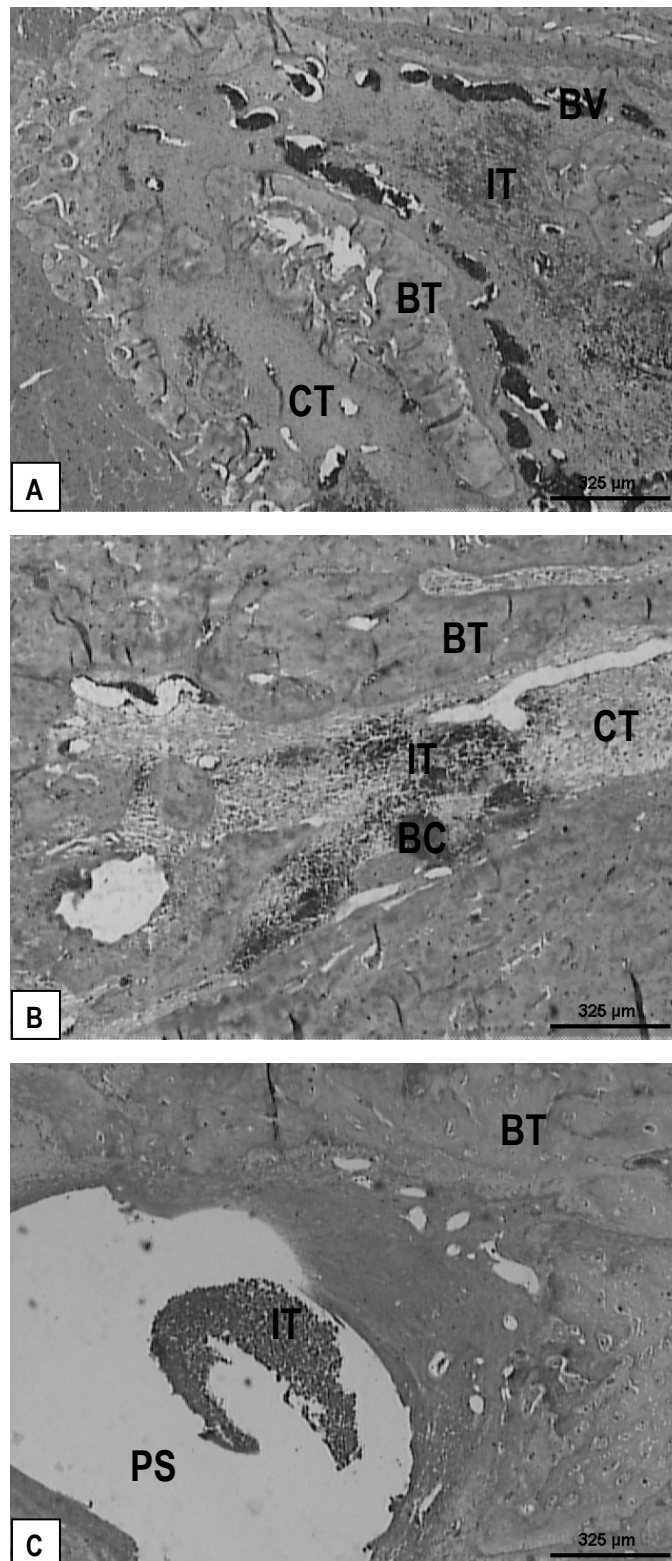
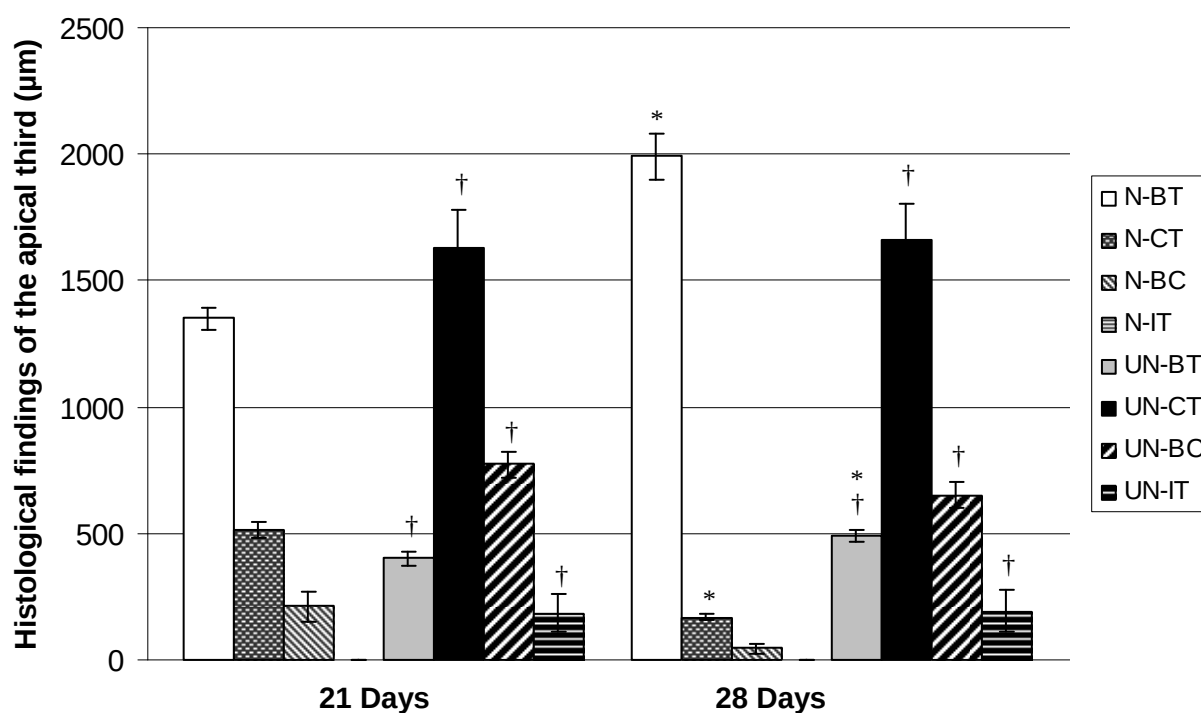
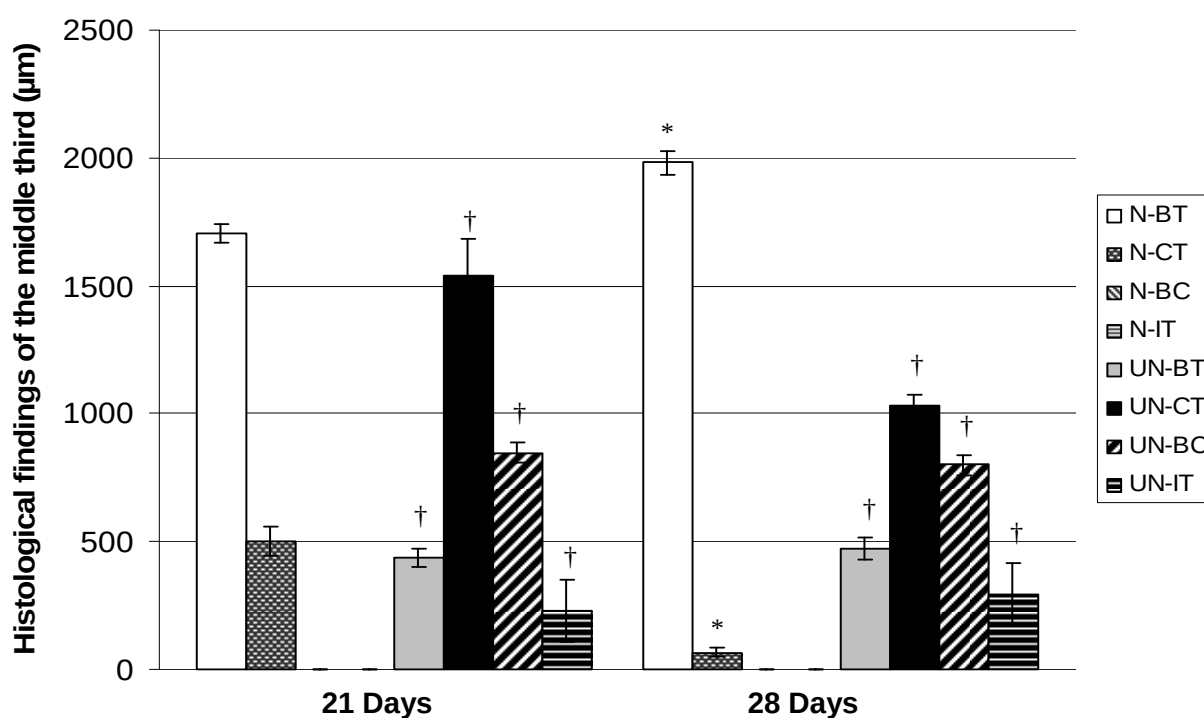


Figure 6 – Photomicrographs of alveolar portions of the upper right incisor of rats belonging to group UN-28. In **A)** apical third; **B)** middle third; **C)** cervical third. Observe: **BC** – blood clot; **IT** – inflammatory tissue; **BT** – bone tissue; **PS** – purulent secretion; **CT** – connective tissue; **BV** – blood vessel. Staining: HE.



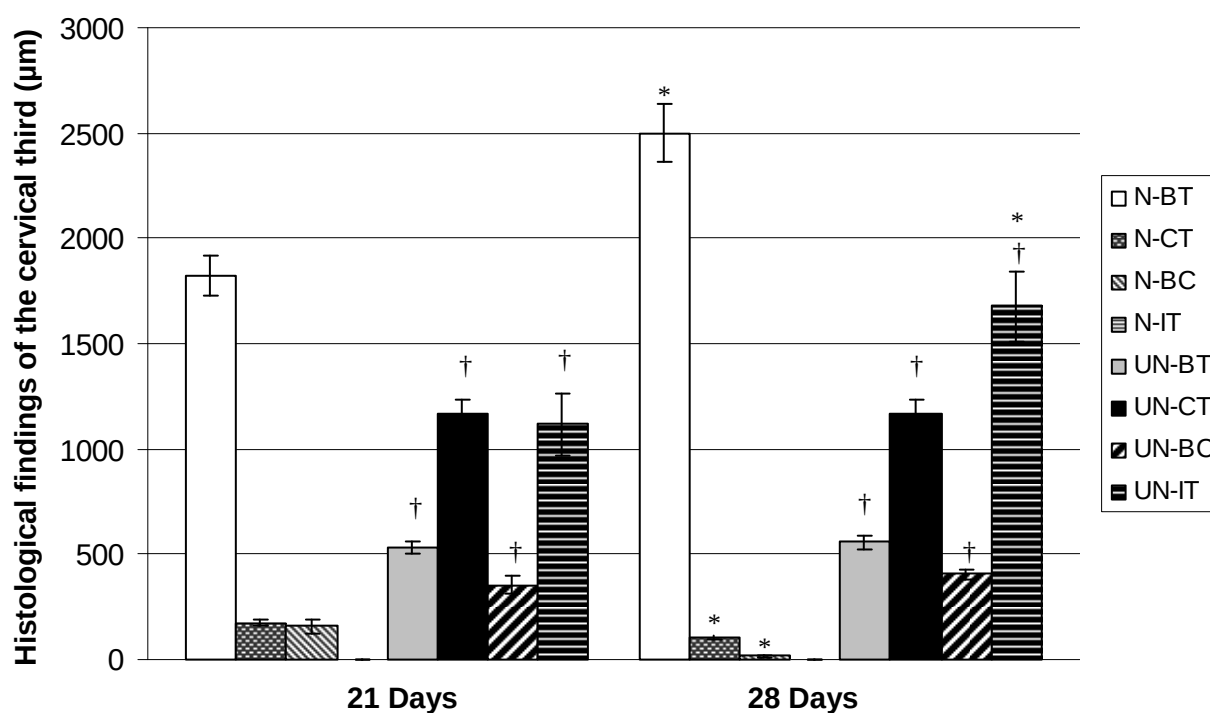
N-BT = Bone tissue found in the nourished animals; N-CT = Connective tissue found in the nourished animals; N-BC = Blood clot found in the nourished animals; N-IT = Inflammatory tissue found in the nourished animals; UN-BT = Bone tissue found in the undernourished animals; UN-CT = Connective tissue found in the undernourished animals; UN-BC = Blood clot found in the undernourished animals; UN-IT = Inflammatory tissue found in the undernourished animals. † = $p < 0.05$, comparing N and UN to BT, CT, BC and IT after 21 and 28 days of alveolitis. * = $p < 0.05$, comparing 21 and 28 days to N in BT and CT and to UN in BT. N-21(n=10); UN-21(n=10); N-28(n=10); UN-28(n=10).

Figure 7 – Histological findings (bone tissue, connective tissue, blood clot and inflammatory tissue) found in the apical third of the alveolus of upper right incisors of the animals belonging to groups N-21, UN-21, N-28 and UN-28.



N-BT = Bone tissue found in the nourished animals; N-CT = Connective tissue found in the nourished animals; N-BC = Blood clot found in the nourished animals; N-IT = Inflammatory tissue found in the nourished animals; UN-BT = Bone tissue found in the undernourished animals; UN-CT = Connective tissue found in the undernourished animals; UN-BC = Blood clot found in the undernourished animals; UN-IT = Inflammatory tissue found in the undernourished animals. † = $p < 0.05$, comparing N and UN to BT, CT, BC and IT after 21 and 28 days of alveolitis. * = $p < 0.05$, comparing 21 and 28 days to N in BT and CT. N-21(n=10); UN-21(n=10); N-28(n=10); UN-28(n=10).

Figure 8 – Histological findings (bone tissue, connective tissue, blood clot and inflammatory tissue) found in the middle third of the alveolus of upper right incisors of the animals belonging to groups N-21, UN-21, N-28 and UN-28.



N-BT = Bone tissue found in the nourished animals; N-CT = Connective tissue found in the nourished animals; N-BC = Blood clot found in the nourished animals; N-IT = Inflammatory tissue found in the nourished animals; UN-BT = Bone tissue found in the undernourished animals; UN-CT = Connective tissue found in the undernourished animals; UN-BC = Blood clot found in the undernourished animals; UN-IT = Inflammatory tissue found in the undernourished animals. † = $p < 0.05$, comparing N and UN to BT, CT, BC and IT after 21 and 28 days of alveolitis. * = $p < 0.05$, comparing 21 and 28 days to N in BT, CT and BC and to UN in IT. N-21(n=10); UN-21(n=10); N-28(n=10); UN-28(n=10).

Figure 9 – Histological findings (bone tissue, connective tissue, blood clot and inflammatory tissue) found in the cervical third of the alveolus of upper right incisors of the animals belonging to groups N-21, UN-21, N-28 and UN-28.

CONSIDERAÇÕES FINAIS



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou que a desnutrição neonatal, mesmo após um período de recuperação nutricional, foi capaz de comprometer os mecanismos de defesa no organismo adulto, visto que na microbiota peri-alveolar o número de UFC nos animais desnutridos apresentou-se menor do que nos nutridos, tanto antes quanto depois da extração. No entanto, esta situação tornou-se invertida após a alveolite, onde se constatou uma maior quantidade de UFC nos animais desnutridos. Com relação ao aspecto qualitativo das bactérias, observou-se um maior desenvolvimento de bactérias gram-negativas nos animais desnutridos, sobretudo, naqueles pertencentes ao grupo DN-28. As bacteremias encontradas foram desencadeadas apenas por bactérias gram-positivas: *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa e *Staphylococcus saprophyticus*, sendo os animais desnutridos aqueles mais acometidos.

A osteocalcina, após 21 dias de comprovação clínica da alveolite, apresentou seus níveis elevados tanto no grupo nutrido quanto no desnutrido, indicando a necessidade de formação de tecido ósseo. Entretanto, após 28 dias do processo de alveolite, seu nível diminuiu no grupo nutrido, pois o alvéolo dentário estava preenchido por tecido ósseo em quase toda sua extensão e permaneceu elevado no desnutrido, devido à tentativa de recuperação da atividade osteogênica. No que diz respeito ao cálcio iônico, constatou-se uma maior concentração do mesmo nos animais nutridos, sobretudo naqueles do grupo N-28. A cicatrização alveolar ocorreu com um discreto retardo nos animais nutridos. No entanto, a dificuldade de reparação alveolar foi bem mais acentuada nos animais desnutridos, visto que além do desenvolvimento da alveolite, estes animais apresentavam as sequelas da desnutrição neonatal. Além disso, o tecido inflamatório foi evidenciado apenas nos animais desnutridos, sendo os mais acometidos aqueles pertencentes ao grupo DN-28. Assim sendo, diante destes resultados, foi possível confirmar todas as hipóteses iniciais estabelecidas nesta tese.

Apesar de alguns estudos terem utilizado o modelo experimental de desnutrição neonatal, sua associação com a alveolite dentária e suas repercussões sobre a microbiota da região peri-alveolar, incluindo o desenvolvimento de bacteremia e a evolução da cicatrização alveolar, envolvendo os níveis de osteocalcina e cálcio iônico ainda não haviam sido exploradas. Além disso, a microbiota normal da região peri-alveolar de ratos foi determinada neste estudo, tal fato mostrou-se de grande valor para a compreensão do processo de alveolite dentária.

A preocupação com os efeitos deletérios desencadeados pela desnutrição neonatal é manifestada pelas políticas de saúde pública. Dentre os vários fatores identificados na população, que levam a esta condição, encontram-se os sócio-econômicos. Nesta tese, foram observadas várias conseqüências provenientes da desnutrição. No entanto, a bacteremia foi aquela em que se obteve maior preocupação, pois esta demonstrou claramente uma associação entre as doenças dentais e sistêmicas. A constatação dos efeitos prejudiciais provocados pela desnutrição neonatal em estudos experimentais servirá de base para as pesquisas epidemiológicas e clínicas e fortalecerão ações governamentais contra a desnutrição neonatal.

Diante dos resultados obtidos é possível delinear as seguintes perspectivas: realizar pesquisas envolvendo a microbiota peri-alveolar em outros processos inflamatórios ou infecciosos que podem acometer a cavidade oral; investigar o efeito da desnutrição sobre a execução de procedimentos odontológicos mais invasivos; avaliar no exudato da alveolite e no soro, citocinas do perfil inflamatório (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN γ e TNF α), em casos de desnutrição ou não; e avaliar os tipos celulares no exudato da alveolite, em casos de desnutrição ou não.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

ABRAMS, S. A.; O'BRIEN, K. O. Calcium and bone mineral metabolism in children with chronic illnesses. Annual Review of Nutrition, v. 24, p. 13-32, 2004.

ADEYEMO, W. L. Etiology of dry socket: additional factors. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, v. 62, p. 519-520, 2004.

AGUILAR, M. R. T.; AHEDO, I. C.; SPIRO, E. N. Cicatrización alveolar posextracción y sus potenciales complicaciones. Revista de la Asociación Dental Mexicana, v. 62, n. 3, p. 91-93, mayo/jun. 2005.

AGUILAR-NASCIMENTO, J. E. Como otimizar o preparo pré-operatório com terapia nutricional. Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral, v. 12, n. 32, p. 2-5, jan./fev./mar. 2010.

ALLEN, M. J. Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. Veterinary Clinical Pathology, v. 32, n. 3, p. 101-113, 2003.

ANDRIOLO, A. A importância dos novos marcadores do metabolismo ósseo. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 43, n. 2, abr. 2007.

ANDRIOLO, A.; MOREIRA, S. R.; SILVA, L. A.; CARVALHO, A. B. de; VIEIRA, J. G. H.; GHIRINGHELLO, M. T.; JULIANO, Y. Cálcio ionizado no soro: estimativa do intervalo de referência e condições de coleta. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 40, n. 2, p. 85-89, abr. 2004.

ARAÚJO, F. R. G. de. Resposta bacteriológica e histológica em processo de alveolite em ratos (*Rattus norvegicus albinus*) tratados com *Mercurius solubilis*. 2006. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

ARAÚJO, F. R. G. de; CASTRO, C. M. M. B.; SEVERO, M. S.; DINIZ, M. F. A.; VIANA, M. T.; EVÊNCIO, L. B. Normal microbiota of the perialveolar region of incisors of rats. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 59, n. 6, p. 1586-1588, 2007.

ARAÚJO, F. R. G. de; CASTRO, C. M. M. B.; SEVERO, M. S.; DINIZ, M. F. A.; VIANA, M. T.; EVÊNCIO, L. B. Effect of *Mercurius solubilis* on the bacteriological response in the alveolitis process in rats. Homeopathy, v. 98, p. 160-164, 2009.

ARAÚJO, M. G.; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction: an experimental study in the dog. Journal of Clinical Periodontology, v. 32, n. 2, p. 212-219, feb. 2005.

ARTEAGOITIA-CALVO, M. I.; DIEZ-GARCIA, M. A.; BARBIER-HERRERO, L.; LANDA-LIONA, S.; SANTAMARÍA-ARRIETA, G.; SANTAMARÍA-ZUAZUA, J. Antibioterapia sistêmica preventiva de la alveolitis seca em la exodoncia del tercer molar inferior: revisión sistemática. Revista del Ilustre Consejo General de Colégios de Odontólogos y Estomatólogos de Espana, v. 7, n. 6, p. 603-611, nov./dec. 2002.

AUKHIL, I. Biology of wound healing. Periodontology 2000, v. 22, p. 44-50, 2000.

BAITELLO, A. L.; NETO, R. C.; FILHO, B. H.; CORDEIRO, J. A.; MACHADO, A. M. O.; GODOY, M. F.; GAIA, F. F. P. Prevalência e fatores associados à bacteremia nos portadores de colecistite aguda litiásica. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 50, n. 4, p. 373-379, 2004.

BALDUCCI-ROSLINDO, E.; MATA, A. C.; MALAGOLI, D. M. Ação do *Symphytum officinale* na reparação do processo alveolar após exodontia. Revista da Faculdade de Odontologia de Lins, v. 15, n. 1, p. 47-52, 2003.

BALDUCCI-ROSLINDO, E.; SILVÉRIO, K. G.; MALAGOLI, D. M. Processo de reparo em feridas de extração dentária em camundongos tratados com o complexo *Symphytum officinale* e *Calendula officinallis*. Revista de Odontologia da UNESP, v. 13, n. 2, p. 181-187, abr./jun. 1999.

BARBER, P. J. Disorders of the parathyroid glands. Journal Feline Medicine Surgery, v. 6, p. 259-269, 2004.

BECHELLI, A. H. Biologia aplicada à implantologia com carga imediata. In: _____. Carga Imediata em Implantologia Oral. São Paulo: Santos, 2006. cap. 2, p. 38-58.

BHATAWADEKAR, S.; BHARDWAJ, R. Actinomycotic bacteraemia after dental procedures. Indian Journal of Medical Microbiology, v. 20, p. 72-75, 2002.

BOECK, E. M.; PANSANI, C. A.; OKAMOTO, T.; GOISSIS, G.; BOECK NETO, R. J.; MARCANTONIO JÚNIOR, E. Implante de hidroxiapatita em alvéolos dentais: estudo histopatológico em ratos. Revista de Odontologia da UNESP, v. 28, n. 1, p. 83-96, 1999.

BORTOLUZZI, M. C.; MANFRO, R.; POGGERE, V.; SILVA, R. D. Incidence of fibrinolytic alveolitis, acute infection, edema, and pain longer than two days after dental extraction. Revista Odonto Ciência, v. 23, n. 2, p. 111-114, 2008.

BRANDÃO, A. C.; BRENTGANI, L. G.; NOVAES JÚNIOR, A. B.; GRISI, M. F. M.; SOUZA, S. L. S. de; TABA JÚNIOR, M.; SALATA, L. A. Histomorphometric analysis of rat alveolar wound healing with hydroxyapatite alone or associated to BMPs. Brazilian Dental Journal, v. 13, n. 3, p. 147-154, 2002.

BREW, M.C.; FIGUEIREDO, J. A. P. de. Tecido ósseo. In: _____. Histologia Geral para a Odontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. 8, p. 95-106.

BROWN, J. L.; POLLITT, E. Malnutrition, poverty and intellectual development. Scientific American, v. 2, p. 38-43, 1996.

BRUNO, M. Endocardite bacteriana em medicina dentária: profilaxia. Revista da Faculdade de Ciências da Saúde, v. 4, p. 158-167, 2007.

BYRNES, M. C.; HUYNH, K.; HELMER, S. D.; STEVENS, C.; DORT, J. M.; SMITH, R. S. A comparison of corrected serum calcium levels to ionized calcium levels among critically ill surgical patients. The American Journal of Surgery, v. 189, p. 310-314, mar. 2005.

CALIXTO, R. F. E.; TEÓFILO, J. M.; BRENTGANI, L. G.; LAMANO CARVALHO, T. L. Implante de um floculado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. Pesquisa Odontológica Brasileira, v. 15, n. 3, p. 257-262, jul./set. 2001.

CALVI, L. M.; BUSHINSKY, D. A. When is it appropriate to order an ionized calcium? Journal of the American Society of Nephrology, v. 19, p. 1257-1260, 2008.

CARDAROPOLI, G.; ARAÚJO, M.; LINDHE, J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites: an experimental study in dogs. Journal of Clinical Periodontology, v. 30, n. 9, p. 809-817, sep. 2003.

CARDOSO, M. J. L.; MUNIZ, L. M. R.; GASPARINI, T. J.; MELUSSI, M. Homeostase do cálcio e marcadores do metabolismo ósseo no hipertireoidismo felino – revisão. Archives of Veterinary Science, v. 12, n. 1, p. 17-27, 2007.

CARVALHO, D. C. L.; ROSIM, G. C.; GAMA, L. O. R.; TAVARES, M. R.; TRIBIOLI, R. A.; SANTOS, I. R.; CLIQUET JÚNIOR, A. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. Revista de Saúde Pública, v. 36, n. 5, p. 647-654, 2002.

CARVALHO, P. S. P. de; LUPPINO, F.; MENDES, V. C. Histofisiologia óssea e os biomateriais aplicados à implantodontia. In: BEZERRA, F. J. B.; LENHARO, A. (Org.). Terapia Clínica Avançada em Implantodontia. São Paulo: Artes Médicas, 2002. cap. 2, p. 17-30.

CARVALHO, P. S. P. de; OKAMOTO, T.; BARBOSA, D. Z. Influência da limpeza cirúrgica e/ou aplicação de “Alvesan” no processo de reparo em feridas de extração dental infectadas. Estudo histológico em ratos. Revista de Odontologia da UNESP, v. 20, p. 165-173, 1991.

CASO, A.; HUNG, L. K.; BEIRNE, O. R. Prevention of alveolar osteitis with chlorhexidine: a meta-analytic review. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics, v. 99, n. 2, p. 155-159, feb. 2005.

CASTILLO, V.; LALIA, J.; RODRÍGUEZ, M.; CASAS, G.; MÁRQUEZ, A. Osteocalcin: a biochemical marker for osteogenesis and metabolic osteopathology during the growth period in dog of large breeds. Revista Científica, FCV-LUZ, v. 9, n. 2, p. 138-142, 1999.

CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system: an introduction. American Journal of Clinical Nutrition, v. 66, n. 2, p. 460-463, 1997.

CHANDRA, R. K. Influence of multinutrient supplement on immune responses and infection-related illness in 50–65 year old individuals. Nutrition Research, v. 22, p. 5-11, 2002.

CHOW, A. W. Infections of the oral cavity, neck, and head. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. (Org.). Principles and Practice of Infectious diseases. 5. ed. Churchill Livingstone: Philadelphia, 2000. p. 689-701.

COLEMAN, R. E. The clinical use of bone resorption markers in patients with malignant bone disease. Cancer, v. 94, p. 2521-2533, 2002.

COMMITTEE ON LABORATORY ANIMAL DIETS. Assembly of life sciences. National Research Council. Control of diet in laboratory animal experimentation. Nutrition Abstracts and Reviews, v. 40, n. 1, p. 413-419, 1979.

COSTA, C. G.; TORTAMANO, I. P.; ARMONIA, P. L.; TORTAMANO, N. Profilaxia da endocardite bacteriana e próteses articulares: benefícios e riscos. Revista do Instituto de Ciências da Saúde, v. 20, n. 2, p. 161-165, jul./dez. 2002.

COSTA, M. B.; LANNA, C. M. M.; BRAGA, M. H.; MAGALHÃES, S. Avaliação da hipercalcemia assintomática em pacientes ambulatoriais. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 44, n. 5, p. 329-335, out. 2008.

DARBY, I.; CURTIS, M. Microbiology of periodontal disease in children and young adults. Periodontology 2000, v. 26, p. 33-53, 2001.

DELAURIER, A.; JACKSON, B.; PFEIFER, D.; INGHAM, K.; HORTON, M. A., PRICE, J. S. A comparison of methods for measuring serum and urinary markers of bone metabolism in cats. Research in Veterinary Science, v. 77, p. 29-39, 2004.

DELMAS, P. D. Clinical use of biochemical markers of bone remodeling in osteoporosis. Bone, v. 13, p. 17-21, 1992.

DELMAS, P. D. Biochemical markers of bone turnover in: theoretical considerations and clinical use in osteoporosis. The American Journal of Medicine, v. 95, p. 11-16, nov. 1993.

DELMAS, P. D. Bone marker nomenclature. Bone, v. 28, p. 575, 2001.

DEVLIN, H.; HOYLAND, J.; NEWALL, J. F.; AYAD, S. Trabecular bone formation in the healing of the rodent molar tooth extraction socket. Journal of Bone and Mineral Research, v. 12, n. 12, p. 2061-2067, 1997.

DIB, J. E.; SANTOS JÚNIOR, P. V. dos; CARVALHO, Y. R. Estudo histológico dos efeitos da estimulação ultra-sônica sobre a reparação óssea alveolar em ratos. Revista de Odontologia da UNESP, v. 23, n. 2, p. 221-229, jul./dez. 1994.

DICKERSON, R. N.; ALEXANDER, K. H.; MINARD, G.; CROCE, M. A.; BROWN, R. O. Accuracy of methods to estimate ionized and "corrected" serum calcium concentrations in critically ill multiple trauma patients receiving specialized nutrition support. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, v. 28, n. 3, p. 133-141, 2004.

DUFOUR, T.; SVOBODA, J. M. Pathogénie bactérienne des parodontolyses. EMC-Odontologie, v. 1, p. 46-57, 2005.

ELSUBEIH, E. S.; HEERSCH, J. N. M. Quantitative assessment of post-extraction healing and alveolar ridge remodelling of the mandible in female rats. Archives of Oral Biology, v. 49, p. 401-412, 2004.

FELDMAN, E. C. Distúrbios das paratireóides. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Org.). Tratado de medicina interna veterinária. 5. ed. São Paulo: Editora Guanabara. 2004. p. 1454-1474.

FERREIRA E SILVA, W. T. Programação pela desnutrição perinatal do controle serotoninérgico da liberação de óxido nítrico por macrófagos alveolares em ratos adultos. 2008. 134 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

FIORETTO, J. R.; QUERIOZ, S. S.; PADOVANI, C. R.; MATSUBARA, L. S.; OKOSHI, K.; MATSUBARA, B. B. Ventricular remodeling and diastolic myocardial dysfunction in rats submitted to protein-calorie malnutrition. American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology, v. 282, p. 1327-1333, 2002.

FURTADO, M. A. H.; SIMONE, J. L. A importância da antibioticoterapia profilática em odontologia na prevenção da endocardite infecciosa. Revista do Instituto de Ciências da Saúde, v. 18, n. 1, p. 49-56, jan./jun. 2000.

GIACOMELLI, F. R. B.; NATALI, M. R. M. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, v. 3, n. 3, p. 239-249, set./dez. 1999.

GOBEL, T. W. F. The T-dependent immune system. In: DAVIDSON, T. F.; MORRIS, T. R.; PAYNE, L. N. (Org.). Poultry Immunology. Oxfordshire: Carfax Publishing, 1996. cap. 24, p. 31-46.

GRIFFITHS, R. D. Keeping up the defenses. Nutrition, v. 20, n. 6, p. 587-589, 2004.

GUARNIERO, R.; BARROS FILHO, T. E. P. de; TANNURI, U.; LEIVAS, T. P.; NEGRI, J. H.; PRADO, M. P.; ETCHEBEHERE, M.; ARRUDA, A. A. F. de; PEREIRA, E. A. R.; CUNHA, M. R. R.; ROBAZZI, P. S. M. Avaliação da resistência óssea com e sem a administração prévia de calcitonina de salmão em ratos com desnutrição protéica. Acta Ortopédica Brasileira, v. 4, n. 1, p. 1-4, jan./mar. 1996.

GUARNIERO, R.; CINAGAVA, M. Y.; SANTANA, P. J. de; BATISTA, M. A.; OLIVEIRA, L. A. A. de; RODRIGUES, C. J.; CINAGAVA, F. T. Influência do componente protéico na consolidação de fraturas: trabalho experimental em ratos. Acta Ortopédica Brasileira, v. 11, n. 4, p. 206-210, out./dez. 2003.

HÄKKINEN, L.; UITTO, V. J.; LARJAVA, H. Cell biology of gingival wound healing. Periodontology 2000, v. 24, p. 127-152, 2000.

HARKNESS, J. E. Biologia e manejo. In: _____. Biologia Clínica de Coelhos e Roedores. São Paulo: Roca, 1993. cap. 2, p. 9-55.

HEANEY, R.P. Calcium, dairy products and osteoporosis. Journal of the American College of Nutrition, v. 19, p. 83-99, 2000.

HOFFMANN, R. Pobreza, insegurança alimentar e desnutrição no Brasil. Estudos Avançados, v. 9, n. 24, p. 159-173, maio/ago. 1995.

INZUCCHI, S. E. Management of hypercalcemia. Diagnostic workup, therapeutic options for hyperparathyroidism and other common causes. Postgraduate Medicine, v. 115, n. 5, p.27-36, may. 2004.

JOSHIPURA, K.; RITCHIE, C.; DOUGLASS, C. Strenght of evidence linking oral conditions and systemic disease. Compendium of Continuing Education in Dentistry Supplement, v. 30, p. 12-23, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: _____. Histologia básica. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap. 8, p. 111-128.

KANYAMA, M.; KUBOKI, T.; AKIYAMA, K.; NAWACHI, K.; MIYAUCHI, F. M.; YATANI, H.; KUBOTA, S.; NAKANISHI, T.; TAKIGAWA, M. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. Archives of Oral Biology, v. 48, n. 10, p. 723-730, oct. 2003.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Periodonto. In: _____. Histologia e Embriologia Oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c1999. cap. 9, p. 281-334.

KNOUSE, M. C.; MADEIRA, R. G.; CELANI, V. J. Pseudomonas aeruginosa causing a right carotid artery mycotic aneurysm after a dental extraction procedure. Mayo Clinic Proceedings, v. 77, n. 10, p. 1125-1130, oct. 2002.

KREUGER, M. R. O.; TERNES, C. E.; MELLO, L. L.; CRUZ, A. B.; LEITE, S. N.; TAMES, D. R. The influence of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* on the healing of infected dental alveoli: A histological study in rats. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, n. 3, p. 349-355, jul./set. 2007.

LAM, D. K.; JAN, A.; SÁNDOR, G. K. B.; CLOKIE, C. M. L. Prevention of infective endocarditis: revised guidelines from the American Heart Association and the implications for dentists. Journal-Canadian Dental Association, v. 74, n. 5, p. 449-453, jun. 2008.

LANDIM, K. T.; JUNQUEIRA, J. C.; ROCHA, R. F. da. Influência da sinvastatina na reparação óssea de mandíbulas de ratas. Pós-Graduação em Revista, v. 5, n. 1, p. 78-83, jan./abr. 2002.

LANGLEY-EVANS, S. C. Nutritional programming of disease: unravelling the mechanism. Journal of Anatomy, v. 215, n. 1, p. 36-51, jul. 2009.

LIN, W. L.; McCULLOCH, C. A.; CHO, M. I. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. Anatatomical Record, v. 240, n. 4, p. 492-506, dec. 1994.

LISBOA NETO, J. A.; MACHADO, J. L.; MELO JÚNIOR, E. J. M. de; RAPOSO, M. J. Avaliação do efeito cicatrizante da aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e do mastruço (*Chenopodium ambrosioides*) em feridas de extração dental em ratos: estudo histológico. Revista ABO Nacional, v. 6, n. 3, p. 66-69, jun./jul. 1998.

LOCKHART, P. B.; BRENNAN, M. T.; SASSER, H. C.; FOX, P. C.; PASTER, B. J.; BAHRANI-MOUGEOT, F. K. Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. Circulation, v. 117, p. 3118-3125, jun. 2008.

MAGRO ÉRNICA, N.; MAGRO FILHO, O.; RANGEL GARCIA, I. Histologic study of use of microfibrillar collagen hemostat in rat dental sockets. Brazilian Dental Journal, v. 14, n. 1, p. 12-15, 2003.

MAGRO FILHO, O.; TOLEDO, F. M. C. de; OKAMOTO, T.; RANGEL GARCIA JÚNIOR, I. Influência da anti-sepsia intrabucal com clorexidina 0,2% na reparação de alvéolo dental. Revista da Associação Paulista de Cirurgias-Dentistas, v. 50, n. 3, p. 243-246, maio/jun. 1996.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 62, n. 1, p. 71-109, mar. 1998.

MARTÍNEZ, A. B.; URÍZAR, J. M. A.; FENOLL, A. B.; CARRIÓN, A. B.; GAY-ESCODA, C.; MOLES, M. A. G.; GUTIÉRREZ-PÉREZ, J. L.; SORIANO, Y. J.; URENÁ, J. L.; LÓPEZ-MARCOS, J. F.; VERA, J. R. M.; PEREA-PÉREZ, E. J.; PRIETO, J. P.; RODRÍGUEZ, J. C. V. Documento de consenso sobre el tratamiento antimicrobiano de las infecciones bacterianas odontogénicas. Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal, v. 9, p. 363-376, 2004.

MARZOLA, C. Processo de reparo alveolar. In: _____. Técnica Exodôntica. 2. ed. São Paulo: Pancast, c1994. cap. XIV, p. 303-326.

MELO JÚNIOR, E. J. M. de; RAPOSO, M. J.; LISBOA NETO, J. A.; DINIZ, M. F. A.; MARCELINO JÚNIOR, C. A. C.; SANT`ANA, A. E. G. Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: microbiological and microscopic analysis. Phytomedicine, v. 9, n. 2, p. 109-116, mar. 2002.

MONTEIRO, C. A. A dimensão da pobreza, da fome e da desnutrição no Brasil. Estudos Avançados, v. 9, n. 24, p. 195-207, 1995.

MONTEIRO, C. A. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. Estudos Avançados, v. 17, n. 48, p. 7-20, 2003.

MORSE, A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. Journal of Dental Research, v. 24, n. 4, p. 143-153, 1945.

NEUMANN, M.; FRIEDMANN, J.; ROY, M. A.; JENSEN, G. L. Provision of high-protein supplement for patients recovering from hip fracture. Nutrition, v. 20, n. 5, p. 415-419, 2004.

NGAPETH-ETOUNDI, M.; ELA, G. A.; ITOUA, E. S.; OBOUNOU, A. Septicemia of dental origin and post-extraction coma. A propos of 3 cases. Odontostomatologie Tropicale, v. 24, n. 94, p. 19-22, jun. 2001.

NICOLLI FILHO, W. D.; PICON, L. C.; OKAMOTO, T.; CARDENUTO, N. The effect of green helium-neon laser on the healing of extraction wounds: histological study in rats. Revista de Odontologia da UNESP, v. 22, n. 2, p. 213-221, 1993.

NUSAIR, Y. M.; YOUNIS, M. H. A. Prevalence, clinical picture, and risk factors of dry socket in a Jordanian Dental Teaching Center. The Journal of Contemporary Dental Practice, v. 8, n. 3, p. 53-63, mar. 2007.

OHYANAGI, H. Introduction to the state of the art of nutrition support in Japan. Nutrition, v. 20, p. 339, 2004.

OKAMOTO, T.; RUSSO, M.C. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. Revista da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, v. 2, p. 153-163, 1973.

OKAMOTO, T.; HAYACIBARA, R. M.; SATO, M. T.; NICCOLI FILHO, W. D. Processo de reparo em feridas de extração dental após implante de colágeno esponjoso: estudo histomorfológico. Revista Paulista de Odontologia, v. 15, n. 5, p. 26-36, set./out. 1993.

OLIVER, R.; ROBERTS, G. J.; HOOPER, L. Penicillins for the prophylaxis of bacterial endocarditis in dentistry (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 2, 2007. Oxford: Update Software.

PAIXÃO, M. P. C. P.; BRESSAN, J. Cálcio e Saúde Óssea: tratamento e prevenção. Revista Saúde e Pesquisa, v. 3, n. 2, p. 237-246, maio/ago. 2010.

PAPA, E. D. Diseminación de la infección odontogénica: Revisión de la literatura. Acta Odontológica Venezolana, v. 38, n. 1, p. 18-32, 2000.

PASTER, B. J.; BOCHES, S. K.; GALVIN, J. L.; ERICSON, R. E.; LAU, C. N.; LEVANOS, V. A.; SAHASRABUDHE, A.; DEWHIRST, F. E. Bacterial diversity in human subgingival plaque. Journal of Bacteriology, v. 183, p. 3770-3783, 2001.

PELCZAR JÚNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Flora normal do corpo humano. In: _____. Microbiologia Conceitos e Aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 2. cap. 17, p. 22-40.

PEÑA, M.; BACALLAO, J. Malnutrition and poverty. Annual Review of Nutrition, v. 22, p. 241-253, 2002.

PEREIRA, M. L. L.; CARVALHO, J. F. C.; FERNANDES, M. H. R.; PERES, F. Efeito da nicotina no processo de formação óssea alveolar: Estudo em culturas celulares de osso alveolar humano. Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial, v. 47, n. 2, p. 79-90, 2006.

POI, W. R.; CARVALHO, P. S. P. de; OKAMOTO, T.; ANDRADE, E. D. de; PANZARINI, S. R. Influência da pasta à base de metronidazol a 10% e lidocaína a 2% sobre o processo de reparo em alvéolo dental infectado: Análise histológica e histométrica em ratos. Revista de Odontologia da UNESP, v. 27, n. 1, p. 53-72, 1998.

POI, W. R.; CARVALHO, P. S. P. de; ANDRADE, E. D. de. Nova pasta para o tratamento da alveolite: estudo histológico do comportamento do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos ao implante de uma pasta à base de metronidazol a 10% e lidocaína a 2%. Revista Gaúcha de Odontologia, v. 47, n. 2, p. 102-109, abr./maio/jun. 1999.

POI, W. R.; CARVALHO JÚNIOR, J. A. R. de; CARVALHO, P. S. P. de; OKAMOTO, T. Influência da pasta Sultan sobre o processo de reparo em alvéolo dental infectado. Análise histológica em ratos. Revista Odontológica do Brasil Central, v. 9, n. 28, p. 9-13, 2000.

POLIMENI, G.; ALBANDAR, J. M.; WIKESJÖ, U. M. E. Prognostic factors for alveolar regeneration: osteogenic potential of resident bone. Journal of Clinical Periodontology, v. 31, p. 840-844, 2004.

RESENDE, T. J. D. de. Alveolite: evidências científicas. 2009. 52 f. Monografia – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2009.

RICIERI, C. B.; ARANEGA, A. M.; TAKAHASHI, A.; LEMOS, F. R. Alveolite: ocorrência e tratamento em consultórios odontológicos de Araçatuba/SP. Revista da Faculdade de Odontologia de Lins, v. 18, n. 1, p. 33-40, 2006.

RICO, H.; REVILLA, M.; CABRERA, J. Biological markers of bone remodeling. Revista Brasileira de Reumatologia, v. 33, n. 6, p. 226-234, nov./dez. 1993.

ROCHA BARROS, V. M. da; ITO, I. Y.; AZEVEDO, R. V. P.; MORELLO, D.; ROSATELI, P. A.; FILIPECKI, L. C. Bacteriemia após exodontia unitária, empregando dois métodos de anti-sepsia intrabucal. Pesquisa Odontológica Brasileira, v. 14, n. 1, p. 19-24, jan./mar. 2000.

ROCHA-DE-MELO, A. P.; CAVALCANTI, J. B.; BARROS, A. S.; GUEDES, R. C. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. Nutritional Neuroscience, v. 9, p. 155-160, jun./aug. 2006.

RODRIGUE, L.; LAVOIE, M.C. Comparison of the proportions of oral bacterial species in BALB/c mice from different suppliers. Laboratory Animals, v. 30, p. 108-113, 1996.

ROSAN, B.; LAMONT, R. J. Dental plaque formation. Microbes and Infection, v. 2, p. 1599-1607, 2000.

SALLES, M. J. C.; SPROVIERI, S. R. S.; BEDRIKOW, R.; PEREIRA, A. C.; CARDENUTO, S. L.; AZEVEDO, P. R. C.; SILVA, T. M.; GOLIN, V. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepsis – revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 45, n. 1, p. 86-92, 1999.

SANTOS, S. S. F. dos; JORGE, A. O. C. Sensibilidade “in vitro” de enterobacteriaceae e pseudomonadaceae isoladas da cavidade bucal humana a agentes antimicrobianos. Pós-Graduação em Revista, v. 2, n. 1, p. 41-44, jan./jun. 1999.

SANTOS, S. S. F. dos; LOBERTO, J. C. S.; MARTINS, C. A. P.; JORGE, A. O. C. Prevalência e sensibilidade in vitro de enterobacteriaceae e pseudomonas isoladas da cavidade bucal e bolsa periodontal de pacientes com periodontite crônica. Pós-Graduação em Revista, v. 5, n. 2, p. 74-83, maio/ago. 2002.

SARAIVA, G. L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, v. 46, n. 1, p. 72-78, fev. 2002.

SEVERINO MARTÍNEZ, A. D.; FILPO RAMÍREZ, A.; LORENZO, A.; FELIX, E. Bacteremia pre y post-quirúrgica en pacientes adultos sometidos a extracción dental. Acta Médica Dominicana, v. 19, n. 5, p. 172-174, sep./oct. 1997.

SHAHAR, D.; SHAI, I.; VARDI, H.; SHAHAR, A.; FRASER, D. Diet and eating habits in high and low socioeconomic groups. Nutrition, v. 21, p. 559-566, 2005.

SILVA, C. C. da; TEIXEIRA, A. S.; GOLDBERG, T. B. L. Impacto da ingestão de cálcio sobre a mineralização óssea em adolescentes. Revista de Nutrição, v. 17, n. 3, p. 351-359, jul./set. 2004.

SILVA, E. M. da; GOMES, S. P.; ULBRICH, L. M.; GIOVANINI, A. F. Avaliação histológica da laserterapia de baixa intensidade na cicatrização de tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo: estudo experimental em ratos. Revista Sul-Brasileira de Odontologia, v. 4, n. 2, p. 29-35, 2007.

SILVA, J. M.; MARCELIANO, M. F. V.; SOUZA, P. A. R. S.; LAMARÃO, S. M. S. Infecção endodôntica como fator de risco para manifestações sistêmicas: revisão da literatura. Revista de Odontologia da UNESP, v. 36, n. 4, p. 357-364, 2007.

SIVIERO, M.; KANEGANE, K.; BISPO, C. G. C.; TORTAMANO, I. P.; ARMONIA, P. L. Evolução das alterações e atualizações do protocolo 2007 da American Heart Association para prevenção da endocardite infecciosa. Revista do Instituto de Ciências da Saúde, v. 27, n. 2, p. 176-180, 2009.

SODEK, J.; McKEE, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. Periodontology 2000, v. 24, p. 99-126, 2000.

SOUZA, C. A. I.; SCARCELLI, E. Agressão por microrganismos da microbiota endógena. Arquivos do Instituto Biológico, v. 67, n. 2, p. 275-281, jul./dez. 2000.

SOUZA, M. O. F.; PEREZ, A. R. H. S.; SOUZA, T. O. F.; MARTINS, M. A. T.; BUSSADORI, S. K.; FERNANDES, K. P. S.; MARTINS, M. D. Incidência de alterações sistêmicas e uso de medicamentos em pacientes atendidos em clínica odontológica. ConScientiae Saúde, v. 6, n. 2, p. 305-311, 2007.

SWARTZ, M. N.; GIBBONS, R.; SOCRANSKY, S. Bacterias endógenas. Microbiología oral. In: DAVIS, B. D. et al. (Org.). Tratado de Microbiología. 4. ed. Barcelona: Masson, 1996. cap. 42, p. 697-705.

TAKARADA, K.; KIMIZUKA, R.; TAKAHASHI, N.; HONMA, K.; OKUDA, K.; KATO, T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. Oral Microbiology and Immunology, v. 19, p. 61-64, 2004.

TOLOSA, E. M. C. de. Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica. 2. ed. São Paulo: Mande, 2003. 331p.

TORRES-LAGARES, D.; INFANTE-COSSIO, P.; GUTIERREZ-PEREZ, J. L.; ROMERO-RUIZ, M. M.; GARCIA-CALDERON, M.; SERRERA-FIGALLO, M. A. Intra-alveolar Chlorhexidine gel for the prevention of dry socket in mandibular third molar surgery. A pilot study. Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal, v. 11, p. 179-184, 2006.

TORRES-LAGARES, D.; SERRERA-FIGALLO, M. A.; ROMERO-RUIZ, M. M.; INFANTE-COSSIO, P.; GARCIA-CALDERON, M.; GUTIERREZ-PEREZ, J. L. Alveolitis seca: Actualización de conceptos. Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal, v. 10, p. 77-85, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Princípios de doença e epidemiologia. In: _____. Microbiologia. 6. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. cap. 14, p. 394-420.

TOTTI, M. A. G.; JORGE, A. O. C.; ALMEIDA, O. P. de; SANTOS, E. B. dos. Recuperação de *Candida Albicans*, *C. Tropicalis*, *C. Guilliermondii* e *C. Krusei* na cavidade bucal de ratos normais e sialoadenectomizados. Revista de Odontologia da UNESP, v. 25, n. 1, p. 119-124, 1996.

TSOLKA, P.; KATRITSIS, D. Infective endocarditis prophylaxis for dental procedures in 2009: what has changed? Hellenic Journal of Cardiology, v. 50, p. 493-497, 2009.

VARGAS, D. M.; AUDÍ, L.; CARRASCOSA, A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 43, n. 4, p. 367-370, 1997.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, v. 43, n. 6, p. 415-422, dez. 1999.

VIEIRA, J. G. H. Diagnóstico laboratorial e monitoramento das doenças osteometabólicas. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 43, n. 2, p. 75-82, abr. 2007.

WAITZBERG, D. Nutrição Pré e Pós-Operatória. Prática Hospitalar, v. 11, n. 62, p. 109-114, mar./abr. 2009.

WALKER, C. B.; KARPINIA, K.; BAEHNI, P. Chemotherapeutics: antibiotics and other antimicrobials. Periodontology 2000, v. 36, p. 146-165, 2004.

WATTS, N. B. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. Clinical Chemistry, v. 45, n. 8, p. 1359-1368, 1999.

YÁÑEZ, O. Profilaxis de la endocarditis infecciosa en el tratamiento quirúrgico odontológico: 1ra. Parte. Odontología Uruguaya, v. 45, n. 1, p. 18-22, jun. 1996.

YAO, E. S.; LAMONT, R. J.; LEU, S. P. Interbacterial binding among strains of pathogenic and commensal oral bacterial species. Oral Microbiology and Immunology, p. 11-35, 1996.

YE, P.; HARTY, D. W. S.; CHAPPLE, C. C.; NADKARNI, M. A.; CARLO, A. A. D. E.; HUNTER, N. *Streptococci* and *Actinomyces* induce antibodies which cross react with epithelial antigens in periodontitis. Clinical and Experimental Immunology, v.131, p. 468-476, 2003.

YEH, C. L. Specific nutrient: role of arginine in sepsis. Nutrition, v. 20, n. 6, p. 581-582, 2004.

YÜCEL, E. A.; ORAL, O.; OLGAÇ, V.; ORAL, C. K. Effects of fibrin glue on wound healing in oral cavity. Journal of Dentistry, v. 31, p. 569-575, 2003.

YUGOSHI, L. I.; SALA, M. A.; BRENTGANI, L. G.; LAMANO CARVALHO, T. L. Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. Brazilian Dental Journal, v. 13, n. 2, p. 92-96, 2002.

APÊNDICE A - Artigo Publicado



APÊNDICE A – Artigo Publicado

Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.59, n.6, p.1586-1588, 2007

Communication

[Comunicação]

Normal microbiota of the perialveolar region of incisors of rats

[Microbiota normal da região perialveolar de incisivos em ratos]

F.R.G. Araújo¹, C.M.M.B. Castro^{2*}, M.S. Severo³, M.F.A. Diniz², M.T. Viana¹, L.B. Evêncio⁴

¹Aluno de pós-graduação - UFPE – Recife, PE

²Laboratório de imunopatologia Keizo-Asami - UFPE
Campus Universitário
50670-901 – Recife, PE

³Aluna de graduação - UFPE – Recife, PE

⁴Departamento de Histologia - UFPE – Recife, PE

Normal microbiota refers to the population of microorganisms inhabiting the skin and mucosa of healthy beings (Paster et al., 2001; Ye et al., 2003). It may benefit the host through microbial antagonism, thereby preventing the excessive growth of harmful microorganisms. Thus, the pathological process is triggered only when there is a disruption of the balance between normal microbiota and pathogenic microbes (Tortora et al., 2000). The oral cavity, for example, presents one of the most concentrated and varied population of microbes (Rosan and Lamont, 2000; Takarada et al., 2004). Koller et al. (2000a), in an experimental study in rats, found that Gram-positive cocci corresponded to the bacteria most commonly encountered in normal oral microbiota deposited on the teeth of these animals. Thus, these cocci accounted for 80% of the total and were distributed as follows: *Enterococcus*, 56%; *Streptococcus*, 14%; and *Staphylococcus*, 30%.

Despite the fact that rodents are the subject of several studies in dentistry, few reports are available on the normal microbiota of the oral cavity, in particular, on normal bacterial microbiota of the perialveolar region of incisors of rats.

Seventy-two male Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), aging from 70 to 90 day-old, weighing between 280 and 330g, obtained from a bioterium, were used. The animals were kept in

propylene cages covered with zinc wire for alternating 12-hour periods of darkness and light, maintained on a solid diet¹ and *ad libitum* water, in accordance with the codes of ethics of the Brazilian College of Experimentation on Animals (Rivera, 1996) and the Institute of Laboratory Animal Resources Committee (NRC, 1992).

The animals were sedated by inhalation of sulphuric ether. Following sedation, the operating table was covered with a sterilized surgical drape and each rat was immobilized using a further surgical drape. Then, the animals were placed in the supine position to facilitate the opening of the mouth and separation of the lips in order to sample the bacterial microbiota from the perialveolar region of the incisors using swabs soaked in 40µl of a 0.9% NaCl sterile solution.

After collecting the microbiota, each swab was placed in a sterile tube containing 460µl of Brain Heart Infusion (BHI). Each sample was subsequently diluted by homogenizing the medium and drawing 100µl, which was then transferred to another sterile tube containing 900µl of BHI. These 1000µl were then homogenized, and with the aid of an 1µl calibrated loop, were spread onto Petri dishes containing blood-agar and Levine-agar for the isolation of Gram-positive and Gram-negative bacteria. The plaques were then incubated at 37°C in a bacteriological chamber for 48h and

Recebido em 17 de agosto de 2006

Aceito em 4 de setembro de 2007

*Corresponding author (autor para correspondência)

E-mail: ccastro@lika.ufpe.br

¹ Ração Labina®, Purina – São Lourenço da Mata, PE – Brasil.

Normal microbiota of the perialveolar...

the colony-forming units (CFU) that developed were counted and their percentages calculated. Glass slides were prepared for performing Gram staining and to visualize the arrangements and shapes of the bacteria. In addition, the enterobacteria kit² was used for identification of Gram-negative bacteria, whereas Staphclin², Novobiocin², Optoquin², Bile Esculin agar² and 6.5% NaCl were used for Gram-positive (Tomás et al., 2007).

Descriptive statistics was used for data analysis in order to obtain the percentage distributions, means and standard deviations (Zar, 1999).

Following analysis of the material collected from the 72 rats, the mean growth of the bacteria was $1.4 \times 10^6 \pm 2.6 \times 10^5$ CFU/ml. In order of frequency, the aerobic bacteria found were as follows: *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus coagulase negative*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *klebsiella pneumoniae* and *Serratia liquefaciens* (Table 1). Gram-positive and Gram-negative bacteria comprised 91.2% and 8.8% of all isolates, respectively.

Table 1. Bacteria isolated from the perialveolar region on incisors of 72 Wistar rats, listed in order of frequency.

Bacteria	Normal microbiota
<i>Bacillus</i> sp.	52-31.2%
<i>Staphylococcus aureus</i>	29-17.3%
<i>Streptococcus viridans</i>	29-17.3%
<i>Corynebacterium</i> sp.	28-16.8%
<i>Staphylococcus coagulase negative</i>	13- 7.8%
<i>Enterococcus</i> sp	11- 6.6%
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	5- 3.0%
<i>Escherichia coli</i> *	8-50.1%
<i>Klebsiella oxytoca</i> *	5-31.2%
<i>Klebsiella pneumoniae</i> *	2-12.5%
<i>Serratia liquefaciens</i> *	1- 6.2%

*Gram-negative

With regard to the aerobic bacteria identified in the oral cavity, the findings are in agreement with those of other authors (Paster et al., 2001; Ye et al., 2003).

The microorganisms found within the oral cavity of domestic animals may be either commensal or pathogenic. Various studies have also revealed that

certain groups or genera of bacteria may be found in the oral microbiota of both humans and animals (Saphir and Carter, 1976). This is in agreement with Marcotte and Lavoie (1998) when they compared the normal microbiota present in humans, monkeys and rats and found the following microorganisms to be present in all three species: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Spirochetes* and *Protozoa*.

In human beings, microorganisms colonize all the oral tissues irrespectively whether or not they are mineralized and their growth and survival depends on local microecological factors. Thus, it was possible to detect a predominance of Gram-positive cocci and bacilli on the surfaces of the teeth (Rodrigues and Newman, 2002), as observed in rats in the present study.

Chow (2000) reported that the proportion of the different species of bacteria varies in accordance to the presence of inflammatory and infectious processes. Genco (1999) demonstrated this occurrence in humans, pointing out that plaque cells associated with a healthy gingiva are mostly Gram-positive, whereas the filamentous forms and Gram-negative bacteria predominated when the gingiva is inflamed. Koller et al. (2000b) observed that the transition from periodontal health to the conditions known as gingivitis and periodontitis involved an increase in the microbiota growing on the tooth surfaces, particularly Gram-positive and Gram-negative cocci and bacilli. Rodrigues and Newman (2002) initially detected in such cases a Gram-positive aerobic microbiota, and later, a Gram-negative anaerobic. Socransky and Haffajee (2005) stated the fact that if this process continues to evolve, in addition to the coccoid form, other types of bacteria, such as fusobacteria, filaments, spirilla and spirochetes could be found.

Thus, a knowledge of this microbiota is extremely important, for it makes possible a comparison between normal microbiota and the inflammatory and infectious processes that take place in their oral cavity, in particular, gingivitis, periodontitis and alveolitis. The identification of normal microbiota from the perialveolar region of rats should therefore make a valuable contribution to future research in this area.

Keywords: rat, microbiota, aerobic bacteria, perialveolar region, alveolitis

² Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda – Pinhais, PR – Brasil.

RESUMO

Identificou-se a microbiota normal da região peri-alveolar de incisivos em 72 ratos Wistar, com 70-90 dias de idade e 280-330g de peso. As bactérias foram coletadas com suabes embebidos em solução salina. Do material depositado em tubo contendo 460µl de Brain Heart Infusion e diluído em 1:10, retirou-se 1µl para semeadura em placas de Petri. O crescimento médio foi $1,4 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^5$ UFC/ml. Segundo a ordem das frequências, as bactérias encontradas foram: *Bacillus* sp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Corynebacterium* sp., *Staphylococcus coagulase negativa*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia liquefaciens*. De todas as bactérias isoladas, as Gram-positivas e as Gram-negativas compreenderam 91,2% e 8,8%, respectivamente. Dentre as Gram-positivas, a mais freqüente foi *Bacillus* sp. (31,2%) e a menos, *Staphylococcus saprophyticus* (3,0%). Quanto às bactérias Gram-negativas, a mais encontrada foi *Escherichia coli* (50,1%) e a menos, *Serratia liquefaciens* (6,2%).

Palavras-chave: rato, microbiota, bactéria aeróbia, região perialveolar, alveolite

REFERENCES

- CHOW, A.W. Infections of the oral cavity, neck, and head. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. (Eds). *Principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000. p.689-701.
- GENCO, R.J. Placa dental microbiana. In: GENCO, R.J.; COHEN, D.W.; GOLDMAN, H.M. (Eds). *Periodontia contemporânea*. 3.ed. São Paulo: Santos, 1999. p.126-134.
- KOLLER, M.M.; MAEDA, N.; SCARPACE, P.J. et al. Desipramine changes salivary gland function, oral microbiota and oral health in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, v.408, p.91-98, 2000a.
- KOLLER, M.M.; PURUSHOTHAM, K.R.; MAEDA, N. et al. Desipramine induced changes in salivary proteins, cultivable oral microbiota and gingival health in aging female NIA Fischer 344 rats. *Life Sci.*, v.68, p.445-455, 2000b.
- MARCOTTE, H.; LAVOIE, M.C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v.62, p.71-109, 1998.
- NRC (National Research Council). Definition, nomenclature, and conservation of rat strains. A report of the Institute of Laboratory Animal Resources Committee on Rat Nomenclature. *ILAR News*, v.34, p.26, 1992.
- PASTER, B.J.; BOCHES, S.K.; GALVIN, J.L. et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.*, v.183, p.3770-3783, 2001.
- RIVERA, E. Ética, bem-estar e legislação. In: COMISSÃO DE ENSINO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (Eds). *Manual para Técnicos em Bioterismo*. São Paulo: Yellow Graph, 1996. p.11-14.
- RODRIGUES, A.M.; NEWMAN, M.G. Microbiologia e imunologia periodontal. In: CARDOSO, R.J.A.; GONÇALVES, E.A.N. (Eds). *Periodontia/Cirurgia/Cirurgia para implantes*. São Paulo: Artes Médicas, 2002. p.21-50.
- ROSAN, B.; LAMONT, R.J. Dental plaque formation. *Microbes Infect.*, v.2, p.1599-1607, 2000.
- SAPHIR, D.A.; CARTER, G.R. Gingival flora of the dog with special reference to bacteria associated with bites. *J. Clin. Microbiol.*, v.3, p.344-349, 1976.
- SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Periodontal microbial ecology. *Periodontol.* 2000, v.38, p.135-187, 2005.
- TAKARADA, K.; KIMIZUKA, R.; TAKAHASHI, N. et al. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol. Immunol.*, v.19, p.61-64, 2004.
- TOMÁS, I.; ALVAREZ, M.; LIMERES, J. et al. Prevalence, duration and aetiology of bacteraemia following dental extractions. *Oral Dis.*, v. 13, p.56-62, 2007.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Princípios de doença e epidemiologia. In: _____. (Eds). *Microbiologia*. 6.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. p.394-420.
- YE, P.; HARTY, D.W.S.; CHAPPLE, C.C. et al. Streptococci and Actinomyces induce antibodies which cross react with epithelial antigens in periodontitis. *Clin. Exp. Immunol.*, v.131, p.468-476, 2003.
- ZAR, J.H. Two ample hypothesis. In: _____. (Eds). *Biostatistical analysis*. 4.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. cap.8, p.122-160.

ANEXO A -

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 59/07

Recife, 20 de junho de 2007

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Profa. Célia Maria Machado Barbosa de Castro**
Setor de Microbiologia Clínica/LIKA - UFPE
Processo nº 008283/2007- 34

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado **“DESNUTRIÇÃO E BACTEREMIA EM PROCESSO DE ALVEOLITE EM RATOS: ANÁLISE BACTERIOLÓGICA E HISTOLÓGICA”**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEA

ANEXO B - Submissão do Primeiro Artigo Original



ANEXO B – Submissão do Primeiro Artigo Original

De: **edoffice@nutsoc.org.uk**

Enviada:terça-feira, 25 de janeiro de 2011 4:40:15

Para: **flavia_regina_@hotmail.com**

Dear Mrs. Araújo,

On 24th Jan 2011, we received your manuscript entitled "Peri-alveolar bacterial microbiota and bacteremia after dental alveolitis in adult rats submitted to neonatal malnutrition" by Flávia Araújo, Célia Castro, Judith Rocha, Bruno Sampaio, Maria de Fátima Diniz, and Liriane Evêncio.

The manuscript has been assigned the Paper number: BJN-2011-016389.

If we have any queries regarding your submission we will contact you within the next few days.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

<http://bjn.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A3P6FXU3A5UDg7F6A9Hke1DKmwygWEmvNTw3c4wZ>

(Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

Sincerely,

Claire Goodstein

Publications Office

British Journal of Nutrition

The Nutrition Society, 10 Cambridge Court, 210 Shepherds Bush Road, London W6 7NJ, UK

Tel: +44 (0)20 7371 6225

Fax: +44 (0)20 7602 1756

E-mail: edoffice@nutsoc.org.uk

Detailed Status Information

Manuscript #	BJN-2011-016389
Current Revision #	0
Submission Date	24th Jan 11
Current Stage	Under Consideration
Title	Peri-alveolar bacterial microbiota and bacteremia after dental alveolitis in adult rats submitted to neonatal malnutrition
Running Title	Microbiota and bacteremia in malnutrition
Manuscript Type	Research Article
Special Section	N/A
Category	Microbiology
Corresponding Author	Flávia Araújo (flavia_regina_@hotmail.com) (Federal University of Pernambuco)
Contributing Authors	Célia Castro , Judith Rocha , Bruno Sampaio , Maria de Fátima Diniz , Liriane Evêncio
Sources of Funding	CAPES (Coordination of Further Training of Higher Education Personnel)
Abstract	The aim of this study was to analyze bacteriological aspects during the process of dental alveolitis, relating it to a higher incidence of bacteremia in undernourished adult rats. We used 40 Wistar male rats, suckled by mothers fed a diet during lactation containing 17% protein in the nourished group (N) or 8% protein in the undernourished group (UN). After weaning, the animals received the Labina standard diet. After 90 days, these animals underwent upper right incisor extraction and induction of alveolitis. The oral microbiota was obtained using a swab and blood culture through the venous blood. These procedures were performed before the extraction, 5 minutes after extraction, on the 21st day after the alveolitis for groups N-21 and DN-21 and on the 28th day after the alveolitis for groups N-28 and DN-28. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The t test was used for parametric data and the Mann-Whitney test for nonparametric data. Statistical significance was considered by assuming a critical level of 5%. Before and after extraction a lower bacterial growth was observed per colony forming units (CFU) in the peri-alveolar region of the upper right incisors of undernourished animals, while the opposite was true after alveolitis, when a larger number of CFU was seen in these animals. The percentage of positive blood cultures obtained after the alveolitis was greater in the undernourished animals. This study thus demonstrated the influence of malnutrition during dental alveolitis in the peri-alveolar microbiota and during the development of bacteremia.
Key Words	Peri-alveolar microbiota, Bacteremia, Dental alveolitis, Neonatal malnutrition
Conflict of Interest	No, there is no conflict of interest that I should disclose, having read the above statement.
Word Count	4134

ANEXO C -

Submissão do Segundo Artigo Original



ANEXO C – Submissão do Segundo Artigo Original

De: **ees.rvsc.0.eba77.06444ca0@eesmail.elsevier.com** em nome de **Research in Veterinary Science** (resvetsci@elsevier.com)

Enviada:terça-feira, 25 de janeiro de 2011 0:04:23

Para: **flavia_regina_@hotmail.com**

Research in Veterinary Science

Manuscript: Dental alveolitis and alveolar healing in rats submitted to neonatal malnutrition

Dear Mrs Araújo,

Your submission has been received by the journal
Research in Veterinary Science.

You will be able to check on the progress of your paper by logging onto the Elsevier Editorial Systems as an Author using the following information:

<http://ees.elsevier.com/rvsc/>
Your username is: flaviaregina

If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/RVSC/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office Staff
Research in Veterinary Science

Elsevier Editorial System(tm) for Research in Veterinary Science
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Dental alveolitis and alveolar healing in rats submitted to neonatal malnutrition

Article Type: Research Paper

Section/Category: Nutrition

Keywords: Osteocalcin; Ionized calcium; Alveolar healing; Neonatal malnutrition; Dental alveolitis

Corresponding Author: Mrs Flávia Araújo,

Corresponding Author's Institution: Federal University of Pernambuco

First Author: Flávia Araújo

Order of Authors: Flávia Araújo; Célia Castro; Judith Rocha; Bruno Sampaio; Chefas Guedes; Liriane Evêncio; Luciano Montenegro

Abstract: The aim of this study was to compare the levels of osteocalcin and ionized calcium with the alveolar healing process in rats undernourished and suffering from dental alveolitis. Forty rats were used, divided randomly into four groups: N-21, DN-21, N-28 and DN-28. After 90 days, the animals underwent extraction and induction of alveolitis. After 21 or 28 days of alveolitis the levels of osteocalcin and ionized calcium were determined and, in addition, the dental alveolus was completely removed. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The t test was used for parametric data and the Mann-Whitney test for nonparametric data. Statistical significance was set at 5%. Osteocalcin levels decreased in group N-28 and increased in group DN-28; the availability of ionized calcium was higher in the nourished animals and the alveolar healing process showed a greater development in the nourished animals.

ANEXO D -

Revisora da Revista Homeopathy



ANEXO D – Revisora da Revista Homeopathy

Para flavia_regina_@hotmail.com

De: **ees.homp.0.cc212.6bec00f7@eesmail.elsevier.com** em nome de **Homeopathy**
(journal@facultyofhomeopathy.org)

Enviada: quarta-feira, 27 de outubro de 2010 6:59:13

Para: flavia_regina_@hotmail.com

Ms. Ref. No.: HOMP-D-10-00058

Title: The effect of homeopathy in bone healing of dental alveolus of irradiated rats.

Homeopathy

Dear Master Flávia Regina Gonçalves de Araújo,

Thank you for taking the time to review the above-referenced manuscript. You can access your comments and the decision letter when it becomes available.

To access your comments and the decision letter, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/homp/>
2. Enter your login details
3. Click [Reviewer Login]

Thank you again for sharing your time and expertise.

If you have not yet activated or completed your 30 days of access to Scopus, you can still access Scopus via this link:

http://scopees.elsevier.com/ees_login.asp?journalacronym=HOMP&username=flaviaregina

You can use your EES password to access Scopus via the URL above. You can save your 30 days access period, but access will expire 6 months after you accepted to review.

Yours sincerely,

Peter Fisher, FRCP, FFhom
Editor-in-Chief
Homeopathy

For any technical queries about using EES, please contact Elsevier Reviewer Support at reviewersupport@elsevier.com

Global telephone support is available 24/7:

For The Americas: +1 888 834 7287 (toll-free for US & Canadian customers)

For Asia & Pacific: +81 3 5561 5032

For Europe & rest of the world: +353 61 709190

Homeopathy

home | main menu | submit paper | guide for authors | register | change details | log out

Contact us
Help ?

 280143
Username: flavia Regina
Role: Reviewer

Completed Reviewer Assignments for Flavia Regina Gonçalves de Araújo, M.D.

Page: 1 of 1 (1 total assignments)

Display 10 results per page.

My Reviewer Number	Manuscript Number	Article Type	Article Title	Status Date	Current Status	Date Reviewer Invited	Date Reviewer Agreed	Date Review Due	Date Review Submitted	Days Taken	Editor's Name	Corr. Author	
Action	1	HOMP-D-10-00058	Full length Article	The effect of homeopathy in bone healing of dental alveolus of irradiated rats.	Oct 27, 2010	Required Reviews Completed	Oct 12, 2010	Oct 12, 2010	Nov 02, 2010	Oct 27, 2010	15	Peter Fisher, FRCP, FPhom	Francisco Carlos Groppo, Ph.D.

Page: 1 of 1 (1 total assignments)

Display 10 results per page.

<< Reviewer Main Menu

 Adobe Acrobat Reader

You should use the free Adobe Acrobat Reader 6 or later for best PDF Viewing results.

Help | Privacy Policy | Terms and Conditions

© 2008 - 2010 Elsevier BV.

<http://ees.elsevier.com/homp/default.asp>

28/10/2010

ANEXO E -

Trabalhos em Congresso



ANEXO E – Trabalhos em Congresso

22 a 24/08
2007 XXII Reunião
Anual da

CERTIFICADO

Certificamos que:

O resumo número 32.007 intitulado **EFEITO DO MERCURIUS SOLUBILIS SOBRE MICROBIOTA DA REGIÃO PERI-ALVEOLAR ANTES E APÓS PROCESSO DE ALVEOLITE EM RATOS de autoria** ¹Cavalcanti, I. M. F.; ²De Araújo, FRG; ³Evêncio, LB; ⁴Severo, MS; ⁵Diniz, MFA; ⁶Fonseca, DLL; ⁷Bezerra, AA; ⁸De Castro, CMMB; ¹departamento de Medicina Tropical, UFPE; ²Nutrição, UFPE; ³Histologia, UFPE; ⁴Medicina Tropical, UFPE; ^{5, 6}LIKA, UFPE; foi apresentado sob a forma de painel na

XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FESBE, realizada na cidade de Lindóia São Paulo, de 22 a 25 de agosto de 2007.

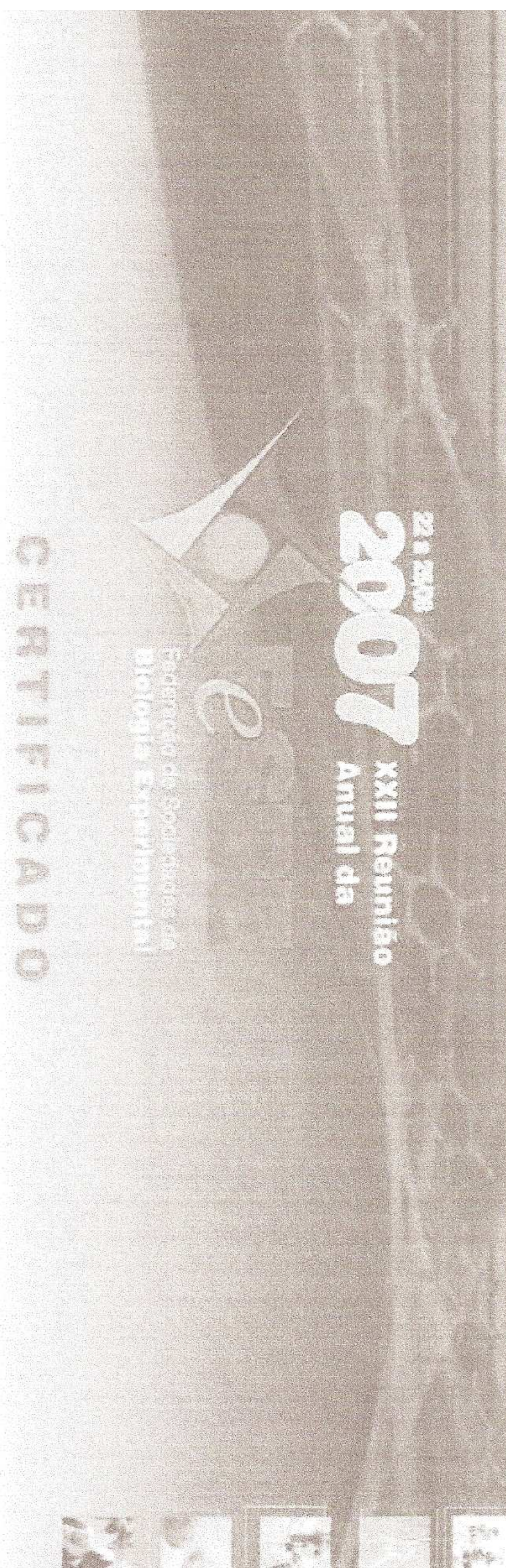
Renata Malus
COMISSÃO ORGANIZADORA

5º OFÍCIO DE NOTAS
Arquivo: Mafael, Tassiana
AUTENTICAÇÃO Combinada com a seguinte descrição:
Válida somente com o selo de autenticação. Dono: F.

8 de Ago. 2007

ASSINATURA
TASSIANA MAFEL
TASSIANA MAFEL
TASSIANA MAFEL

ASSINATURA
TASSIANA MAFEL
TASSIANA MAFEL
TASSIANA MAFEL



Certificamos que:

O resumo número 44.043 intitulado RESPOSTA HISTOLÓGICA DA CICATRIZAÇÃO EM PROCESSO DE ALVEOLITE EM RATOS E EFEITO DO MERCURIUS SOLUBILIS de autoria: Bezerra, A. A.;² De Araújo, F. R. G.;³ Evêncio, L. B.;⁴ Severo, M. S.;¹ Fraga, S. N.;⁵ De Castro, C. M. M. B.;¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - Setor Microbiologia Clínica, UFPE;^{2,3} Departamento de Prótese e Cirurgia Buco-Facial, UFPE;⁴ Departamento de Medicina Tropical, UFPE; foi apresentado sob a forma de painel na

XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental FESBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia São Paulo, de 22 a 25 de agosto de 2007.

CONFERE COM O ORIGINAL
UFPE 08/09/2009
Prof. Dr. Juandete Maria Soares
Chefe de Esquadra do CCB
SIAPE 1133223

Renata M. L. L. L.
COMISSÃO ORGANIZADORA



FeSBE 2009

19 a 22 de agosto de 2009
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 24.002

**RELAÇÃO ENTRE A MICROBIOTA BACTERIANA PERI-ALVEOLAR
APÓS EXTRAÇÃO DENTÁRIA E PROCESSO DE ALVEOLITE EM
RATOS.**

Rocha, Ja, Araújo, Frg, Fonseca, Dll, Diniz, Mfa, Sampaio, B, Castro,
Cmmb

Nutrição/Universidade Federal de Pernambuco, UFPE foi apresentado
sob a forma de painel

na XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia
Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP,
de 19 a 22 de agosto de 2009.

Comissão Organizadora





FeSBE 2009

19 a 22 de agosto de 2009
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 29.014

A DESNUTRIÇÃO PRECOCE NÃO ALTEROU A PRODUÇÃO DE
ÓXIDO NÍTRICO, TAXA DE FAGOCITOSE, RESPOSTA
LEUCOCITÁRIA E HEMATIMÉTRICA EM RATOS TREINADOS E
SUBMETIDOS AO ESTRESSE DE CONTEÇÃO.

Fonseca, D. L. L, Viana, M. T, Rocha, J. A, Perez, M. C, Araújo, F. R. G,
Castro, C. M. M. B

Nutrição / Universidade Federal de Pernambuco, UFPE foi apresentado
sob a forma de painel

na XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia
Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP,
de 19 a 22 de agosto de 2009.

Comissão Organizadora





FeSBE 2009

19 a 22 de agosto de 2009
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 33.014

**MICROBIOTA BACTERIANA PERI-ALVEOLAR DE RATOS
SUBMETIDOS A DESNUTRIÇÃO NEONATAL APÓS EXTRAÇÃO
DENTÁRIA E PROCESSO DE ALVEOLITE**

Rocha, J. A. , Araújo, F. R. G. , Diniz, M. F. A. , Sampaio, b. , Fonseca,
D. L. L. , Castro, C. M. M. B.

Nutrição/Universidade Federal de Pernambuco, UFPE foi apresentado
sob a forma de painel

na XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia
Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP,
de 19 a 22 de agosto de 2009.

Comissão Organizadora





19 a 22 de agosto de 2009
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 29.023

ADAPTAÇÃO LEUCOCITÁRIA, HEMATIMÉTRICA E MORFOLOGICA
AO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO DE RATOS DESNUTRIDOS
PRECOCEMENTE.

Fonseca, D. L. L., Rocha, J. A., Viana, M. T., Perez, M. C., Araújo, F. R. G,
Castro, C. M. M. B

Nutrição / Universidade Federal de Pernambuco, UFPE foi apresentado
sob a forma de painel

na XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia
Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP,
de 19 a 22 de agosto de 2009.

Comissão Organizadora





FeSBE 2009

19 a 22 de agosto de 2009
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 09.016

MICROBIOTA BACTERIANA CONJUNTIVAL EM PRÉ-OPERATÓRIO
DE PACIENTES COM DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À
IDADE E PACIENTES SUBMETIDOS À CIRURGIA DE CATARATA
Medeiros, R. A. ³, Rocha, J. A. ³, Fonseca, D. L. L. ³, Araujo, F. R. G. ^{1,3},
Diniz, M. F. A. ³, de Castro, C. M. M. B. ^{1,2,3}

¹ Depto de Medicina Tropical, UFPE ² Universidade Federal de
Pernambuco, UFPE ³ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami,
LIKA-UFPE foi apresentado sob a forma de painel

na XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia
Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP,
de 19 a 22 de agosto de 2009.

Comissão Organizadora





FeSBE 2009

19 a 22 de agosto de 2009
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 33.013

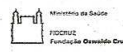
**RELAÇÃO ENTRE DESNUTRIÇÃO NEONATAL E MICROBIOTA
BACTERIANA PERI-ALVEOLAR APÓS EXTRAÇÃO DENTÁRIA E
PROCESSO DE ALVEOLITE EM RATOS**

Araújo, F. R. G. , Fonseca, D. L. L. , Diniz, M. F. A. , Sampaio, B. ,
Rocha, J. A. , Castro, C. M. M. B.

Nutrição/Universidade Federal de Pernambuco, UFPE foi apresentado
sob a forma de painel

na XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia
Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP,
de 19 a 22 de agosto de 2009.

Comissão Organizadora





FeSBE 2009

19 a 22 de agosto de 2009
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 24.001

**DESNUTRIÇÃO NEONATAL E BACTEREMIA APÓS EXTRAÇÃO
DENTÁRIA E PROCESSO DE ALVEOLITE EM RATOS**

Araújo, F. R. G. , Rocha, J. A. , Diniz, M. F. A. , Sampaio, B. , Fonseca,
D. L. L. , Castro, C. M. M. B.

Nutrição/Universidade Federal de Pernambuco, UFPE foi apresentado
sob a forma de painel

na XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia
Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP,
de 19 a 22 de agosto de 2009.

Comissão Organizadora



Organização
Pan-Americana
de Saúde

CNPq

FAPERJ

FAPESP

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Coordenação de Amparo

FINEP



V Reunião Regional FeSBE 2010

Federação de Sociedades de
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

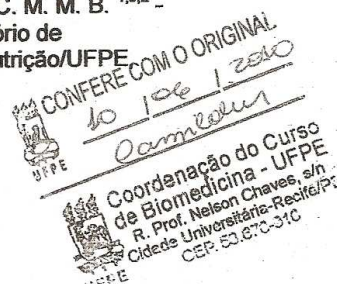
DE 27 A 29 DE MAIO DE 2010

Hotel Parque dos Coqueiros
Aracaju - SE

CERTIFICADO

Certificamos que

o trabalho 41.002 - ALVEOLITE INDUZIDA EM RATOS SUBMETIDOS
À EXTRAÇÃO DENTÁRIA E MICROBIOTA PERI-ALVEOLAR. de
autoria de Raelle, R. A. ^{2,1}, Rocha, J. A. ^{2,1}, Araújo, F. R. G. ^{1,2}, Fonseca,
D. L. L. ^{1,2}, Diniz M. F. A. ², Sampaio, B. ^{1,2}, de Castro, C. M. M. B. ^{1,3,2} -
¹ Univesidade federal de Pernambuco, UFPE ² Laboratório de
Imunopatologia Keizo Asami, LIKA/UFPE ³ Depto de Nutrição/UFPE
NUT/UFPE foi apresentado sob a forma de painel na



V Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia
Experimental - FeSBE, realizada no Hotel Parque dos Coqueiros
Aracaju - SE, de 27 a 29 de maio de 2010.

Comissão Organizadora

Agradecimentos:





FeSBE 2010

25 a 28 de agosto de 2010
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 18.009 intitulado PRODUÇÃO DE IL-10 POR LINFÓCITOS: ESTUDO DA INFECÇÃO CELULAR, IN VITRO, POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINA SENSÍVEL E METICILINA RESISTENTE de autoria Costa, T. B., Moraes, N. G., Almeida, T. M, Araújo, F. R. G, Lima, K. M, de Castro, C. M. M. B3 - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE Depto de Medicina Tropical, UFPE3 Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, UFPE, foi apresentado sob a forma de painel na

XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 25 a 28 de agosto de 2010.

Comissão Organizadora

*Conteúdo com o original
Recife, 03/09/2010*
Walter Leite Galdino
Assistente em Administração
Dep. de Medicina Tropical
UFPE
1133780





25 a 28 de agosto de 2010
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 10.007 intitulado MICROBIOTA BACTERIANA PERI-ALVEOLAR E DESNUTRIÇÃO NEONATAL APÓS EXTRAÇÃO DENTÁRIA E PROCESSO DE ALVEOLITE EM RATOS. de autoria Almeida, T. M, Araújo, F. R. G, Sampaio, B, Rocha, J. A, Diniz, M. F. A, Castro, C. M. M. B - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, UFPE UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, UFPE3 UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, UFPE4 UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, UFPE5 UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, UFPE, foi apresentado sob a forma de painel na

XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 25 a 28 de agosto de 2010.

Comissão Organizadora



*Conforme com o original
Recorre 03/09/2010*

Walter Leite Galdino
Assistente em Administração
Dep. de Medicina Tropical
SIAPE-1133749
UFPE



FeSBE 2010

25 a 28 de agosto de 2010
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 10.023 intitulado BACTEREMIA APÓS PROCESSO DE ALVEOLITE DENTÁRIA EM RATOS ADULTOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO NEONATAL de autoria Sampaio, B., Araújo, F. R. G., Diniz, M. F. A, Rocha, J. A., Costa, T. B., de Castro, C. M. M. B. + 3 Depto de Nutrição, POSNUTRI Universidade Federal de Pernambuco, UFPE Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA, foi apresentado sob a forma de painel na

XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 25 a 28 de agosto de 2010.

CONFERE COM O ORIGINAL
02/09/2010

Comissão Organizadora

Cecília Arruda
Cecília Nascimento Arruda
Técnica em Assuntos Educacionais
Programa de Pós-Graduação em Nutrição
UFPE Matrícula SIAPE 1755076





FeSBE 2010

25 a 28 de agosto de 2010
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 26.056 intitulado DOSAGEM DE OSTEOCALCINA E CÁLCIO IÔNICO EM RATOS SUBMETIDOS A DESNUTRIÇÃO NEONATAL APÓS 21 E 28 DIAS DO PROCESSO DE ALVEOLITE DENTÁRIA de autoria Araújo, F. R. G., Sampaio, B, Rocha, J. A., Diniz, M. F. A., Guedes, C. S., de Castro, C. M. M. B - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, foi apresentado sob a forma de painel na

XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 25 a 28 de agosto de 2010.

Comissão Organizadora





FeSBE 2010

25 a 28 de agosto de 2010
Águas de Lindóia – São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 26.043 intitulado CICATRIZAÇÃO DE ALVÉOLOS DENTÁRIOS APÓS 21 E 28 DIAS, DO PROCESSO DE ALVEOLITE, EM RATOS SUBMETIDOS A DESNUTRIÇÃO NEONATAL de autoria Araújo, F. R. G., Sampaio, B., Baratella-evêncio, L., Montenegro, L. T., Pontes-filho, N. T., de Castro, C. M. M. B. - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, foi apresentado sob a forma de painel na

XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 25 a 28 de agosto de 2010.

Comissão Organizadora



ANEXO F -

Co-orientação de Monografia



ANEXO F – Co-orientação de Monografia



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

CERTIFICADO

Certifico que FLÁVIA REGINA GONÇALVES DE ARAÚJO- MSc, Co-orientou o trabalho de Monografia intitulada "BACTEREMIA EM RATOS ADULTOS NUTRIDOS E DESNUTRIDOS APÓS PROCESSO DE ALVEOLITE DENTÁRIA" do aluno Bruno Sampaio do Curso de Graduação em Biomedicina, no ano de 2009.

Recife, 12 de Janeiro de 2010.


Coordenação do Curso
de Biomedicina - UFPE
R. Prof. Nelson Chaves, s/n
Cidade Universitária-Recife/PE
UFPE CEP: 50.670-910