



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Júlio de Mesquita Filho"

*Carolina de Barros Morais Cardoso*

DISSERTAÇÃO

INFLUÊNCIA DA INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA NA  
SEVERIDADE DA PERIODONTITE APICAL

ARAÇATUBA-SP

2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Júlio de Mesquita Filho"

*Carolina de Barros Morais Cardoso*

**INFLUÊNCIA DA INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA NA  
SEVERIDADE DA PERIODONTITE APICAL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Odontológica, área de concentração em Endodontia.

Orientador: Prof. Adj. Luciano Tavares Angelo Cintra

ARAÇATUBA-SP

2019

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

C268i Cardoso, Carolina de Barros Morais.  
Influência da insuficiência renal aguda na severidade da  
periodontite apical / Carolina de Barros Morais Cardoso. --  
Araçatuba, 2019.  
82 f. : il.; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientador: Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra

1. Periodontite apical 2. Lesão renal aguda 3. Inflamação  
4. Desordens sistêmicas I. Título

Black D64  
CDD 617.6

*Dedicatória*

||Dedico esse trabalho às pessoas que mais amo e admiro na vida.

**Meus pais, Elizabete e Estefani.**

Vocês estão presentes desde os meus primeiros passos.. as minhas primeiras palavras ditas.. a minha primeira volta de bicicleta sem rodinha.. sentiram o meu desespero com a minha primeira nota baixa na escola enquanto eu pensava que esse seria o maior problema da minha vida inteira.. não me deixaram desistir dos longos 8 anos de aula de inglês.. estiveram presentes quando entrei na faculdade que eu tanto queria e comemoraram comigo quando me formei.. vibraram quando entrei no mestrado e aqui estamos nós.. finalizando mais um ciclo. Estes são alguns fatos que vivemos ao longo destes 26 anos juntos. E acredito que o fato de eu estar aqui neste momento, é porque devo muito à vocês.. Pais que me deram todo o amor, educação, proteção, valores e exemplos de honestidade. Pais que foram PAIS, com letra maiúscula, sem tirar nem pôr. Que acreditaram nos meus sonhos. Que fizeram dos meus sonhos, seus próprios sonhos. Que vibraram comigo em cada momento feliz e que sofreram quando algo não ia bem.. E quando estes momentos não tão bons chegavam, eu sabia que a 400km dali havia uma mãe incansável que se ajoelhava e pedia à Deus para que me desse força e coragem para enfrentar as adversidades. E só o fato de eu saber disso, já era o suficiente. Obrigada por todo amor que me foi dado. Obrigada por me ensinarem valores que o dinheiro não compra. Obrigada por entenderem minha ausência em datas importantes e por nunca me cobrarem nada além do que podia oferecer no momento. Obrigada por cada vez que me mandaram erguer a cabeça e seguir em frente. Obrigada por me apoiarem em todas as decisões e por serem meus maiores incentivadores. Amo vocês!

*Agradecimentos*

## **Agradecimentos Especiais**

À **Deus**, pelo dom da vida e por estar sempre presente. Nos momentos em que me senti desamparada foi nos Teus braços que encontrei a paz e a calma. Obrigada por cuidar tão bem de mim, por guiar todos os meus passos e por me mostrar que a minha vontade nem sempre é a mesma que a do Senhor, e tudo bem, pois espero que a Tua vontade sempre prevaleça.

Ao meu irmão **Estefani**, por todo apoio e por ser a minha maior e melhor ponte com o passado. Obrigada por tudo o que já vivemos juntos e por ser parte fundamental na nossa família. Um dia espero ter o coração tão bom quanto o seu. Seria capaz de dar a minha vida pela sua.

À minha filha canina **Chanel**, por ser a minha grande companheira durante o mestrado. Me acalmou, me trouxe paz e muito amor. Saber que apesar de eu passar o dia todo fora de casa você estaria me esperando feliz da vida sempre foi um grande conforto. Obrigada por fazer meus dias mais felizes!

Aos meus segundos pais, minha prima **Leide** e seu marido **Josemir**, pelo suporte que ambos têm me dado nesta nova etapa. Por terem aberto as portas da casa de vocês e por realmente cuidarem de mim como se fosse filha. Vocês são pessoas maravilhosas e só tenho a agradecer por todo amor, cuidado e carinho.

## Agradecimentos aos Professores

Agradeço à **Prof<sup>a</sup> Mariane Maffei Azuma**, minha primeira “Chefe” que acabou se tornando muito mais do que isso. É minha amiga que por várias vezes foi mãe, irmã, cúmplice, filha, confidente e, acima de tudo, minha professora. Da vida científica e da vida real. Desde a primeira vez que te vi, soube que nasceu para fazer o que faz e o faz como ninguém. Tenho muita sorte por ter sido introduzida nesse mundo “científico” por você. Me ensinou que para se fazer um bom trabalho é imprescindível ter responsabilidade, seriedade e comprometimento. Além disso, me mostrou também como é possível conciliar o trabalho e uma vida feliz quando se faz o que ama com leveza e bom humor. Serei eternamente grata pela oportunidade e por tudo o que consegui conquistar graças à sua ajuda. Sei que sempre estará presente nos momentos importantes da minha vida, assim como eu farei questão. Obrigada pela amizade tão bonita e sincera que construímos. Tenho muito orgulho de você e sei que realizará coisas mais incríveis ainda, Maricota.

Agradeço ao meu orientador **Prof<sup>o</sup> Luciano Tavares Angelo Cintra** pela oportunidade, suporte e paciência nesses anos de orientação. Obrigada por ter confiado à mim um trabalho de tanta relevância e tão desafiador, que me fez duvidar a princípio se seria capaz de desenvolver. Graças ao Sr. professor, pude perceber que sou capaz de fazer muita coisa. Obrigada pelos inúmeros ensinamentos (tanto na graduação, quanto no Mestrado e Especialização), obrigada pelas incontáveis vezes em que o Sr. encontrou uma solução para cada dificuldade, obrigada por explicar cada detalhe de forma impecável e pela paciência em repetir mil vezes caso fosse necessário para que eu entendesse. Agradeço por abrir as portas da sua residência para que tivéssemos momentos de confraternização, estendo também o agradecimento à sua esposa, **Milena**, que sempre me tratou tão bem e me proporcionou momentos muito felizes. O senhor é pai, marido, filho, irmão, professor da graduação, pós e especialização, coordenador da pós, orientador de ICS e pós-graduandos (e sabemos que não são poucos orientados), revisor, palestrante.. entre outras tantas coisas. E o melhor de tudo é saber que o senhor desempenha tudo isso por prazer, porque gosta, e faz tudo com perfeição. Peço perdão pelas vezes em que falhei, que não desenvolvi algo como esperado e o decepcionei.. Saio daqui com a certeza de que fui orientada pelo melhor de todos e com um único sentimento: GRATIDÃO.

À **Prof<sup>a</sup> Suely Regina Mogami Bomfim** que foi parte fundamental neste trabalho. Obrigada pela ajuda, paciência, por abrir as portas do seu laboratório (mesmo que um desses dias incluísse sair de lá às nove horas da noite em plena sexta-feira chuvosa), por todo cuidado e gentileza. Professora, tenho certeza de que é uma ótima profissional e também uma ótima mãe só pela forma como sempre me tratou. Obrigada pelas conversas, pelas risadas e todos os bons momentos que tivemos juntas. Às vezes tudo o que precisamos é de uma palavra amiga, um sorriso no rosto e um

abraço acolhedor, e sempre que fui até a senhora, era assim que me recebia. Obrigada por ser tão “mãe” em todos os momentos. Agradeço também por compor a minha banca de defesa de mestrado e estar presente em um momento tão especial! Obrigada por tudo, professora!

Ao **Profº Gustavo Sivieri de Araújo** por todo aprendizado, boa convivência e ajuda nos experimentos. O Sr. também faz parte deste trabalho e agradeço muito por sempre ser tão solícito e por ter aceito prontamente compor a banca de defesa. Além disso, ousou dizer que o Sr. acabou se tornando um grande amigo. Obrigada pelas conversas, cafés, preocupações e por dividir conosco todos os seus ensinamentos. Foi um grande prazer conhecê-lo e conviver com o senhor, professor.

À **Profª Renata Samuel** por aceitar meu convite para ser membro suplente da banca de defesa e por ser exemplo de profissional e pessoa. Com certeza é inspiração para muitas pessoas, inclusive para mim.

Aos **Profºs Rogério de Castilho Jacinto, Elói Dezan Júnior e João Eduardo Gomes-Filho**, por todos os ensinamentos compartilhados, atenção, boa convivência e por serem grandes exemplos de pessoas e profissionais.

Ao **Profº Edilson Ervolino** que abriu as portas do seu laboratório para que parte deste trabalho fosse realizada. Obrigada pela gentileza de sempre, pelas considerações feitas como banca examinadora do meu Exame Geral de Qualificação e por toda ajuda, professor.

À **Profª Cristiane Duque** que compôs a banca do Exame Geral de Qualificação e fez contribuições importantíssimas para este trabalho. Obrigada por todo cuidado ao corrigi-lo, professora. Tenho muita admiração por você!

À todos os **professores da FOA-UNESP** que fizeram parte do meu aprendizado e se tornaram grandes inspirações para mim.

### **Agradecimento aos funcionários**

Aos funcionários do departamento **Nelci, Carlos e Peterson. Nel**, obrigada por todo o tempo que passamos juntas, por ter me ensinado boa parte das coisas que sei e por me tratar tão bem sempre. **Carlos e Peterson**, obrigada pelos cafés, chás, serviços prestados e boa convivência.

Aos funcionários da FOA do Centro, **Andressa e Márcio**, por serem as primeiras pessoas que eu via todos os dias e por me receberem sempre com um “bom dia”. Vocês fizeram jus à frase “um bom dia pode melhorar o dia de alguém”. Obrigada por melhorarem os meus dias todos os dias.

Aos funcionários do Biotério Central, **Camilo e João Batista** pela paciência e por terem me fornecido as dezenas de animais que precisei para a execução deste trabalho.

## **Ao modelo de Estudo**

Aos **animais** utilizados, essenciais para o desenvolvimento deste projeto.

## **À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**

Agradeço à **FAPESP** pela concessão da bolsa que foi fundamental para minha manutenção na pós-graduação, além dos recursos oferecidos para o desenvolvimento do projeto.

## **Aos amigos**

Agradeço à minha grande amiga e companheira nesta jornada, **Marina Carminatti**. Dividimos muitas risadas, aflições, crescimentos, aprendizados, experimentos, pacientes, desafios, preocupações e muita ressaca (rs). Mas acima de tudo, sempre estivemos uma ao lado da outra oferecendo suporte. Você não imagina o quanto foi importante ter você nesse processo todo e sinceramente já sinto falta de te ter por perto todos os dias. Não te conheci durante a graduação, mas Graças a Deus nos encontramos na pós. Talvez, um dos propósitos tenha sido esse. Uma segunda chance dos nossos caminhos se cruzarem. Te agradeço por tudo, minha amiga. E estarei torcendo por você! Que sua vida seja incrível, repleta de coisas boas e o principal: que seja FELIZ. Tenho certeza de que no futuro iremos olhar para trás e iremos nos lembrar com carinho de tudo o que vivemos juntas. Que o nosso próximo encontro seja em breve.

À minha grande amiga de graduação, **Letícia Cabrera Capalbo**. Não sei nem como agradecer por tudo o que você já fez por mim e por todos os momentos que vivemos juntas. Você é uma irmã que a faculdade me presenteou e que quero levar para o resto da vida. Obrigada por todas as risadas, conversas, carinho, festas, desabafos, pela cumplicidade, preocupação, cafézinhos e por fazer questão de sempre estarmos juntas para que pudéssemos colocar o assunto em dia apesar da correria. Me parte o coração pensar que não terei mais você por perto, mas tenho certeza de que isso irá fortalecer ainda mais a amizade que construímos. Estarei torcendo por você nesta nova etapa de pós-graduação, amiga! Tenho certeza de que você será muito feliz e realizada. Obrigada por tudo! Agradeço também ao seu companheiro de anos e meu amigo de pós-graduação **Renan Dal Fabbro**. Agradeço pelos bons momentos dentro e fora do departamento, mas principalmente, agradeço por cuidar tão bem de uma

amiga tão especial como a Lê. Nos vemos em breve, casal!! Quem sabe no noivado de vocês, rs!

À minha grande amiga **Amanda Andolfatto**, por ter me recebido tão bem logo na primeira semana de mestrado e por ser a primeira amiga que fiz na pós. Amandinha, obrigada por ser tão você! Tão alegre, sincera, parceira, sensível, prestativa e ser pura luz! Obrigada por todos os bons momentos que vivemos, pelos desabafos, por confiar em mim, pelos lanchinhos pós-expediente, congressos, conversas e por se preocupar comigo! Sua amizade é um presente que a pós graduação me deu e espero leva-la pelo resto da vida! Você é muito especial e sinto sua falta todos os dias.

Ao meu casal preferido e futuros afilhados **Pedro Henrique Chaves** e **Daniela Marques**. Obrigada por todos os momentos vividos juntos, risadas, conversas, pousos fornecidos, jantinhas aos domingos, carinho e boa vontade. Pessoas como vocês são raras hoje em dia e eu tive muita sorte em encontrá-los. Amo vocês como se fossem meus irmãos e amo ainda mais os corações que possuem. Obrigada por tudo que fizeram e ainda fazem por mim! Saibam que estarei sempre aqui torcendo por vocês! Levo a amizade que construímos no meu coração com muito carinho. Espero vê-los em breve, meus amigos!

Aos que contribuíram diretamente para o desenvolvimento deste trabalho, **Leopoldo Cosme-Silva**, que me ajudou nos experimentos, no fornecimento de materiais e na realização da imunohistoquímica. Além disso, me perguntou diariamente se eu estava precisando de algo. Obrigada por tudo, Leozinho! Torço muito por você. À **Letícia Citelli Conti**, por ter me explicado desde início sobre o desenvolvimento do projeto e por ter participado ativamente dos experimentos. Além disso, agradeço a calma, as risadas e os bons momentos. Foi um grande prazer trabalhar com você, Lê. Às alunas de iniciação científica (hoje formadas) **Taís Gonçalves** e **Marina Ottoni**, por me ajudarem a cuidar dos animais e pelos bons momentos que passamos juntas. Desejo que todos vocês tenham muito sucesso e sejam felizes. Gratidão!

Às minhas amigas de pós-graduação **Ana Maria Veiga Vasques**, **Cristiane Cantiga** e **Lariana Camacho**. Obrigada pela amizade, pelas risadas, conversas e cuidado que sempre tiveram comigo. Incrível como vocês sempre estiveram dispostas em me ajudar, tenham a certeza de que serei eternamente grata. Foi um prazer dividir esta etapa da minha vida com pessoas tão queridas e especiais como vocês. Levo-as no meu coração e espero reencontrá-las em breve.

Ao meu amigo odontopediátrico **Heitor Ceolin Araújo**. No dia em que te vi na primeira aula da pós, já quis ser sua amiga porque vi que você é do tipo de gente que faz bem ter por perto.. e eu não estava enganada. Obrigada por ser tão alto astral, tão feliz, tão amante da vida e por contagiar todos ao seu redor. Fui contagiada pela sua felicidade e alegria de viver e só tenho a agradecer por isso. Obrigada pelas inúmeras risadas,

conversas, desabafos, conselhos, festinhas e tantas outras coisas que vivemos. Já sinto sua falta!

Às minhas amigas **Lara Cervantes, Betina Commar, Luara Teixeira e Isabela Catanoze** que estão presentes na minha vida desde a graduação e se fizeram presentes na pós também. Obrigada por todos os momentos que vivemos juntas, estarei torcendo muito por todas vocês e levarei no coração tudo o que vivemos juntas ao longo desses 7 anos.

Aos meus colegas e amigos de pós-graduação **Flávia Piazza, Caroline Loureiro, Juliana Trizzi, Jimena Lama, Marina Cury, Carlos Bueno, Francine Benetti, Paulo Tobias, Felipe Moraes e Arianny Késia** pelos momentos vividos e pela convivência.

Aos meus amigos de uma vida inteira **Isabella Junqueira, Fábio Deziderio, Marco Aurélio Piva, Tais Colleti e Tamires Colleti**. Só nós sabemos o quanto nos enche o coração ver o outro conquistando algo, e quero que saibam que vocês também fizeram parte desta, mesmo que a distância. Obrigada pelas conversas, conselhos, risadas, pelos momentos tão únicos quando estamos reunidos, por sempre entenderem a minha ausência e por mesmo assim, não permitirem que nossa amizade mudasse com o tempo. Bom, acho que amizade de verdade é isso. Sou muito feliz por tê-los em minha vida, por poder ser eu mesma sem julgamentos e por sempre relembrarmos de tudo o que já vivemos com tanto carinho.

Aos alunos de iniciação científica **Mariana Justo, Julia Pantarotto e Michael** pelo prazer de conviver com vocês e poder aprender diariamente com suas dúvidas e questionamentos. Vocês são exemplos de ICs e tenho certeza de que irão longe!

À todos aqueles que me ajudaram a chegar até aqui, minha eterna gratidão.

*"Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe."*

Clarice Lispector

“Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano. Sempre que alguém descobre esse poder, algo antes considerado impossível se torna realidade.”

Albert Einstein

CARDOSO, CBM. **Influência da insuficiência renal aguda na severidade da periodontite apical**, 2019. Dissertação (Mestre em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

## RESUMO

**Objetivo:** Este trabalho teve como objetivo verificar a influência da Insuficiência Renal Aguda (IRA) na severidade da periodontite apical (PA) em Ratos Wistar. **Métodos:** Foram utilizados sessenta e quatro ratos divididos em 4 grupos e 2 períodos de análise (n=8): Controle (C), IRA, PA e IRA+PA. A IRA foi induzida por meio de uma aplicação diária de Gentamicina (100 mg/Kg/dia) durante 8 dias, via intraperitoneal. A PA foi induzida pela exposição pulpar dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito. Após 15 e 30 dias da indução da PA, os animais foram anestesiados, a urina foi coletada para a urinálise e sedimentoscopia, e o sangue foi coletado para análise do hemograma, creatinina, proteína sérica e ureia. Em seguida, os animais foram eutanasiados, os rins coletados para análise histológica e as mandíbulas e maxilas removidas e processadas para análise histomorfométrica e imunohistoquímica para IL-6, IL-17, IL-23 e TNF- $\alpha$ . **Resultados:** Para urinálise, a quantidade de proteínas foi maior nos grupos PA, IRA e IRA+PA quando comparados ao controle, em ambos os períodos experimentais ( $p < 0,05$ ). Na sedimentoscopia, foram encontrados cilindros granulosos, fosfato amorfo e carbonato de cálcio nos grupos IRA e IRA+PA. No hemograma, o número de hemácias, hemoglobina e volume globular foram menores nos grupos IRA e IRA+PA em 15 e 30 dias comparados aos grupos C e PA ( $p < 0,05$ ); já o volume corpuscular médio foi menor no grupo IRA+PA no período de 15 dias, comparado aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Com relação ao leucograma, o número de leucócitos apresentou-se maior nos grupos IRA e IRA+PA no primeiro período experimental com diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ), já no segundo período experimental os grupos PA, IRA e IRA+PA não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre si ( $p > 0,05$ ). Na análise dos parâmetros bioquímicos do soro, os níveis de ureia e creatinina foram

maiores nos grupos IRA e IRA+PA ( $p < 0,05$ ), comparados aos outros grupos experimentais em ambos os períodos. Já os níveis de proteína, se apresentaram reduzidos nos grupos PA, IRA e IRA+PA, entretanto, sem diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ). Os rins foram analisados histologicamente e foi comprovada a lesão renal em todos os animais induzidos. Com relação ao infiltrado inflamatório, no primeiro período experimental o grupo PA apresentou quatro espécimes com infiltrado discreto e quatro espécimes com infiltrado moderado, enquanto o grupo IRA+PA apresentou infiltrado discreto em todos os espécimes; já no segundo período experimental, o grupo PA apresentou infiltrado inflamatório mais intenso quando comparado ao grupo IRA+PA, apresentando, desta forma, em ambos os períodos experimentais, diferença estatística significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Na análise histométrica, o grupo PA apresentou maior perda óssea aos 15 dias quando comparado ao grupo IRA+PA ( $p < 0,05$ ). No segundo período experimental, ambos os grupos com PA não apresentaram diferenças estatísticas entre si ( $p > 0,05$ ), embora a reabsorção óssea do grupo PA tenha sido maior. Na análise imunohistoquímica, TNF- $\alpha$  apresentou padrão de imunomarcação variando de alto a extremamente alto no grupo PA e predominantemente baixo a moderado em IRA+PA em ambos os períodos experimentais ( $p < 0,05$ ). Já IL-23 apresentou padrão de imunomarcação extremamente alto de forma predominante no grupo PA e padrão alto no grupo IRA+PA aos 15 dias ( $p < 0,05$ ). Para IL-6 e IL-17 não houve diferenças estatísticas entre os grupos PA e IRA+PA em ambos os períodos experimentais ( $p > 0,05$ ). **Conclusão:** A partir dos resultados obtidos, foi observado que a associação da periodontite apical com a insuficiência renal aguda leva à alterações nos parâmetros sanguíneos do hemograma, parâmetros bioquímicos do soro, no perfil inflamatório, na perda óssea e no padrão de imunomarcação da lesão periapical.

**Palavras-chave:** Periodontite apical. Lesão renal aguda. Inflamação. Desordens sistêmicas.

CARDOSO, CBM. **Influence of acute renal failure on the severity of apical periodontitis**, 2019. Dissertação (Mestre em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

### ABSTRACT

**Objective:** This study aimed to verify the influence of Acute Renal Failure (ARF) on the severity of apical periodontitis (AP) in Wistar rats. **Methods:** Sixty-four rats divided into 4 groups and 2 periods of analysis (n = 8) were used: Control (C), ARF, AP and ARF+AP. IRA was induced by daily application of Gentamicin (100 mg/kg/day) for 8 days, intraperitoneal route. AP was induced by the pulp exposure of the upper and lower right and first and second molars. After 15 and 30 days of AP induction, the animals were anesthetized, the urine was collected for urinalysis and sedimentation, and the blood was collected for hemogram, creatinine, serum protein and urea analysis. Afterwards, the animals were euthanized, the kidneys collected for histological analysis and the jaws and jaws removed and processed for histomorphometric and immunohistochemical analysis for IL-6, IL-17, IL-23 and TNF- $\alpha$ . **Results:** For urinalysis, the amount of protein was higher in the AP, ARF and ARF+AP groups when compared to the control, in both experimental periods ( $p < 0.05$ ). In the sedimentation, granular cylinders, amorphous phosphate and calcium carbonate were found in the ARF and ARF+AP groups. In the hemogram, the number of red blood cells, hemoglobin and globular volume were lower in the ARF and ARF+AP groups at 15 and 30 days compared to the C and AP groups ( $p < 0.05$ ); mean corpuscular volume was lower in the ARF+AP group in the 15-day period, compared to the other groups ( $p < 0.05$ ). Regarding the leukogram, the number of leukocytes was higher in the ARF and ARF+AP groups in the first experimental period with significant statistical differences ( $p < 0.05$ ), in the second experimental period, the groups PA, IRA and ARF+AP did not present significant statistical differences among themselves ( $p > 0.05$ ). In the analysis of serum biochemical parameters, urea and creatinine levels were higher in the ARF and ARF+AP groups ( $p < 0.05$ ), compared to the other experimental groups in both periods. Protein levels were reduced in the AP, ARF and ARF+AP groups, however, without statistical differences ( $p > 0.05$ ). The kidneys

were histologically analyzed and renal damage was demonstrated in all induced animals. Regarding the inflammatory infiltrate, in the first experimental period the AP group presented four specimens with discrete infiltrate and four specimens with moderate infiltration, while the ARF+AP group showed discrete infiltrate in all the specimens; in the second experimental period, the AP group presented a more intense inflammatory infiltrate when compared to the ARF+AP group, thus presenting a statistically significant difference between the groups in both experimental periods ( $p < 0.05$ ). In the histometric analysis, the AP group presented greater bone loss at 15 days when compared to the ARF+AP group ( $p < 0.05$ ). In the second experimental period, both groups with AP did not present statistical differences ( $p > 0.05$ ), although the bone resorption of the AP group was higher. In the immunohistochemical analysis, TNF- $\alpha$  presented immunostaining pattern ranging from high to extremely high in the AP group and predominantly low to moderate in ARF + AP in both experimental periods ( $p < 0.05$ ). Already IL-23 presented an extremely high immunostaining pattern predominantly in the AP group and high in the ARF+AP group at 15 days ( $p < 0.05$ ). For IL-6 and IL-17, there were no statistical differences between the AP and ARF+AP groups in both experimental periods ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** It was observed that the association of apical periodontitis with acute renal failure leads to alterations in the blood parameters of the hemogram, serum biochemical parameters, inflammatory, bone loss and the pattern of periapical lesion immunostaining.

**Key-words:** Apical periodontitis. Acute kidney injury. Inflammation. Systemic disorders.

## LISTA DE FIGURAS

### *Páginas*

FIGURA 1 – Administração intraperitoneal de Gentamicina para a indução da IRA 34

FIGURA 2 – Protocolo anestésico utilizado e exposição dos molares para a indução da periodontite apical 35

FIGURA 3 – Timeline experimental 37

FIGURA 4 – Confeção dos cortes histológicos do tecido renal 38

FIGURA 5 – Análise microscópica dos sedimentos encontrados na urina dos animais com doença renal. Cilindros granulosos (\*), fosfato amorfo (\*\*) e carbonato de cálcio (setas) 46

FIGURA 6 – Imagem macroscópica do rim: à esquerda, rim de animal do grupo C; seguido pelo rim de animal portador de IRA após 15 dias de desenvolvimento da doença; e, à direita, rim de animal portador de IRA após 30 dias de desenvolvimento da doença 50

FIGURA 7 – Coloração em HE dos rins. Grupo C com a presença de túbulos proximais normais (setas); grupo IRA-15 dias com a presença de dilatação tubular com células epiteliais necrosadas (\*); grupo IRA - 30 dias com a presença de dilatação tubular com 51

células epiteliais necrosadas (\*). Magnificação de 400x

FIGURA 8 – Fotomicrografias representativas de todos os grupos experimentais. A-H, correspondentes ao primeiro período experimental. I-P, correspondentes ao segundo período experimental. Coloração em H.E. Magnificação de 100x (A-D e I-L) e 400x (E-H e M-P) 53

FIGURA 9 – Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais submetidos à técnica de imunohistoquímica no primeiro período experimental. A-D correspondem a imunomarcção do TNF-  $\alpha$ ; E-H correspondem a IL-6; I-L correspondem a IL-7; e M-O corresponde a IL-23. Magnificação de 400x 56

FIGURA 10 – Fotomicrografias representativas de todos os grupos experimentais submetidos à técnica de imunohistoquímica no segundo período experimental. A-D correspondem a imunomarcção do TNF-  $\alpha$ ; E-H correspondem a IL-6; I-L correspondem a IL-7; e M-O corresponde a IL-23. Magnificação de 400x 58

## LISTA DE TABELAS

### *Páginas*

TABELA 1 – Divisão dos diferentes grupos experimentais	36
TABELA 2 – Escores atribuídos para o padrão de imunomarcção	43
TABELA 3 – Característica da urinálise dos quatro grupos no período de 15 dias	45
TABELA 4 – Característica da urinálise dos quatro grupos no período de 30 dias	46
TABELA 5 – Média e desvio padrão dos parâmetros sanguíneos de ambos os períodos experimentais de todos os grupos	48
TABELA 6 – Média e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos no soro de ambos os períodos experimentais de todos os grupos	49
TABELA 7 – Mediana dos scores atribuídos para análise histológica de ambos os períodos experimentais de todos os grupos	55
TABELA 8 – Valores médios de área ( $\times 10^4 \mu\text{m}^2$ ) e percentual de perda óssea para análise histométrica de ambos os períodos	56

experimentais de todos os grupos

TABELA 9 – Scores e medianas atribuídos ao primeiro período experimental (15 dias), para a imunomarcção das interleucinas 6, 17, 23 e TNF- $\alpha$  de todos os grupos 58

TABELA 10 – Scores e medianas atribuídos ao segundo período experimental (30 dias), para a imunomarcção das interleucinas 6, 17, 23 e TNF- $\alpha$  de todos os grupos 60

## LISTA DE ABREVIATURAS

### *Páginas*

DAB – Tetracloridrato de Diaminobenzidina 40

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetra-acético 39

CHCM – Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média 27

Hb – Hemoglobina 27

He – Hemácias 27

H.E – Hematoxilina e Eosina 54

IL-6 – Interleucina 6 28

IL-17 – Interleucina 17 28

IL-23 – Interleucina 23 28

IRA – Insuficiência Renal Aguda	25
PA – Periodontite apical	29
PBS – Tampão Fosfato Alcalino	38
PBS-TX – Tampão Fosfato Alcalino acrescido de 0,1% de Triton	40
PCV – Volume Globular	27
PTP – Proteína Plasmática Total	27
TNF- $\alpha$ – Fator de Necrose Tumoral Alfa	28
VCM – Volume Corpuscular Médio	27

# SUMÁRIO

*Páginas*

1 -	INTRODUÇÃO	25
2 -	OBJETIVOS	31
3 -	MATERIAL E MÉTODOS	32
4 -	FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	41
5 -	RESULTADOS	45
6 -	DISCUSSÃO	61
7 -	CONCLUSÃO	69
8 -	REFERÊNCIAS	70
9 -	SUPORTE FINANCEIRO	80
10 -	ANEXO (Certificado do Comitê de Ética no uso de animais)	81



# 1- INTRODUÇÃO

Os rins são órgãos complexos, essencialmente reguladores, que exercem uma variedade de funções primordiais para a homeostasia orgânica. A maioria destas funções envolve uma combinação de excreção e reabsorção de substâncias, produzindo um balanço de entrada e saída. É responsabilidade da função renal regular o equilíbrio hídrico e eletrolítico, controlar a pressão sanguínea, a produção de glóbulos vermelhos, a produção da vitamina D, excretar metabólitos, secretar substâncias bioativas como hormônios, e promover a manutenção do equilíbrio acidobásico (Eaton & Pooler 2006, Berne & Levi 2009).

Segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia, aproximadamente 13 milhões de brasileiros apresentam algum grau de problema renal, sendo que 95 mil estão em estágio grave dependendo de hemodiálise ou na fila do transplante. Além disso, o número de casos vem aumentando 10% ao ano. Os principais grupos de risco são pacientes com histórico de doença renal na família, idosos, obesos, diabéticos e hipertensos (Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2019).

A insuficiência renal pode ser subdividida em aguda e crônica. A insuficiência renal aguda (IRA) é caracterizada pela perda súbita da capacidade de seus rins filtrarem resíduos, sais e líquidos do sangue. Quando isso ocorre, os resíduos podem chegar a níveis perigosos e afetar a composição química do sangue, perdendo seu equilíbrio (Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2019). A IRA é uma complicação que ocorre em cerca de 5% das hospitalizações e até 30% das internações em UTI, e a Necrose Tubular Aguda (NTA) é responsável por mais de 50% da IRA em pacientes hospitalizados e mais de 76% dos pacientes em UTI (Nunes et al. 2010), possuindo taxas de mortalidade entre 15 e 60% (Kellum 2008).

Uma das formas de se desenvolver a IRA é a exposição a um agente nefrotóxico. A IRA nefrotóxica corresponde a 30% dos casos de lesão renal, sendo a nefrotoxicidade um efeito indesejável de diversos fármacos de uso rotineiro (Hosohata 2016). As drogas que causam toxicidade tubular alteram a

função mitocondrial, interferindo no transporte tubular, aumentando estresse oxidativo e a formação de radicais livres (Zager 1997, Markowitz et al. 2005). Dentre as drogas associadas a este mecanismo patogênico da lesão, estão os aminoglicosídeos, anfotericina B, quinolonas, rifampicina, adefovir, cidofovir, tenofovir, cisplatina, contrastes radiológicos, dentre outras (Cynthia 2008). Assim, é possível afirmar que a utilização de antibióticos nefrotóxicos, sozinhos ou em combinação com outros fármacos são as causas principais da IRA (Mehta et al. 2004, Pannu & Nadim 2008).

Aminoglicosídeos são antimicrobianos usados principalmente no tratamento de pacientes com infecções graves causadas por bactérias gram-negativas aeróbias, porém com alto poder nefrotóxico (Appel 1977). Os principais representantes deste grupo são gentamicina, amicacina, estreptomicina e tobramicina. A nefrotoxicidade induzida por gentamicina está relacionada com a dose e a duração do tratamento e caracteriza-se por necrose tubular (Rodriguez-Barbero et al. 1992), decréscimos acentuados na taxa de filtração glomerular (TFG), no coeficiente de ultrafiltração (KF) e no fluxo de plasma glomerular (Schor et al. 1981). Ressalta-se que o uso na rotina terapêutica de gentamicina (80 mg/kg) por mais de sete dias, tem sido uma causa comum de nefrotoxicidade em aproximadamente 30% dos pacientes (Derakhshanfar et al. 2007). Assim, devido à alta nefrotoxicidade, a gentamicina tem sido a droga de escolha para a indução da IRA em modelos animais (Farombi & Ekor 2006, Tavafi & Ahmadvand 2011, Aygun et al. 2012, Zager 2007, Yarijani et al. 2016, Valipour et al. 2016).

Dentre outros achados laboratoriais que auxiliam na caracterização da disfunção renal, podemos citar a proteinúria, por exemplo, o excesso de albumina, que é detectada na urina por quantificação e/ou por fita reagente de imersão (Greco et al. 1985). Assim, torna-se pertinente observar as funções renais por meio da urinálise, exame simples que consiste na combinação do método observacional sobre a quantidade de urina obtida, coloração e grau de turbidez, juntamente com a utilização de fitas reagentes de imersão onde é possível detectar a presença de proteína. Além disso, a sedimentoscopia para avaliar a presença de sedimentos urinários característicos de lesão renal também consiste em uma avaliação importante.

O hemograma é um exame básico de rotina utilizado para verificação inicial de possíveis alterações sistêmicas, pois permite a avaliação da série vermelha e branca, além das plaquetas, tanto quantitativamente quanto qualitativamente (Odagiri et al. 2011). A análise por hemograma é comumente utilizada em modelo animal, por possibilitar a padronização dos espécimes e ser representativa para a correlação com estudos em humanos (Azeez et al. 2010, López et al. 2011). Além disso, a partir do hemograma é possível quantificar alguns biomarcadores presentes na IRA, especialmente os que estão relacionados com a série vermelha, como o número de hemácias (He), hemoglobina (Hb), o volume globular (VG) e o volume corpuscular médio (VCM).

O método rotineiro usado para avaliar a função renal é a mensuração da concentração plasmática de substâncias excretadas pelos rins, tais como a ureia e creatinina (Santin et al. 2006). Estas substâncias são excretadas pelos rins através de filtração glomerular e sua concentração plasmática depende da filtração glomerular. A creatinina é resultante do metabolismo da creatina, encontrada nos músculos, cuja conversão ocorre 24 horas ao dia e é livremente filtrada. Alterações significativas nos níveis séricos de creatinina podem indicar disfunção renal (Spanaus et al. 2010) e, o seu aumento, torna-se significativo quando existe perda de mais de 50% da função dos rins (Harita et al. 2009, Ioannidou & Swede 2011).

A ureia é um produto do catabolismo de aminoácidos e proteínas, formada principalmente no fígado, sendo filtrada pelos rins e também pode ser considerado um biomarcador. Quando a concentração plasmática de ureia encontra-se elevada, a disfunção renal está presente. Alteração nos níveis deste marcador já foi relacionada com o uso da gentamicina (Adeneye et al. 2008, Shirwaikar et al. 2004). Também julgamos importante avaliar os níveis de proteínas séricas no sangue, pois é um indicativo de lesão glomerular ou tubular (Banday et al. 2008). Estes níveis, quando elevados, são causados pelo agravamento da lesão renal causada pela gentamicina (Papanikolaou et al. 1992, Banday et al. 2008). Deste modo, a presença de proteínas séricas de forma exacerbada no soro sugere a presença da IRA.

Para a confirmação local das lesões renais e comprovação do método de indução da IRA, torna-se indicado realizar a análise histológica dos rins, analisando a presença ou não de dilatação tubular, necrose de células epiteliais e células com núcleo picnóticos.

A infecção endodôntica causa o desenvolvimento da periodontite apical (PA) (Colic et al. 2010) que é caracterizada, histologicamente, por um tecido granulomatoso infiltrado por diferentes tipos de células inflamatórias (Lukic et al. 2008). Radiograficamente é possível identificar a periodontite apical por meio da observação de área radiolúcida junto ao periápice de dentes portadores da infecção endodôntica. Estas áreas são comumente chamadas de lesões periapicais e são formadas devido à resposta do hospedeiro ao estímulo antigênico proveniente dos canais radiculares infectados (Xiong et al. 2009). A resposta do hospedeiro envolve o recrutamento de diferentes células inflamatórias e a participação de uma extensa rede de mecanismos imunológicos, incluindo a produção de citocinas (Xiong et al. 2009, Colic et al. 2010). Algumas destas citocinas são sintetizadas em resposta a presença de bactérias e seus produtos, os quais induzem e mantêm a resposta inflamatória (Xiong et al. 2009, Colic et al. 2010), promovendo a degradação da matriz extracelular e posteriormente a reabsorção óssea (Nair 2004, Graves et al. 2011). Empregando modelo animal padronizado, foi observado que a infecção endodôntica, quando associada com a diabetes e à doença periodontal, pode aumentar os níveis de triglicérides (Cintra et al. 2013a), creatinina (Cintra et al. 2013b), hemoglobina glicada (Cintra et al. 2014c), mediadores pró-inflamatórios como a IL-17 (Cintra et al. 2014a), além de alterar alguns parâmetros do hemograma, destacando-se a série branca (Cintra et al. 2014b), bem como é capaz de alterar o sinal insulínico do sangue e do tecido muscular (Astolphi et al. 2015, Astolphi et al. 2013).

Estudos realizados mostraram que a presença de quatro dentes com infecção endodôntica foi capaz de aumentar os níveis de triglicérides (Azuma et al. 2018), células inflamatórias (Azuma et al. 2017), e mediadores pró-inflamatórios, como IL-17, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-23 e óxido nítrico no tecido hematológico de ratos (Cintra et al. 2016b), o que sugere que a presença de múltiplos focos da infecção endodôntica exercem uma influência mais

significativa e podem comprometer a homeostase de um indivíduo. A interleucina 6 (IL-6), a interleucina 17 (IL-17), a interleucina 23 (IL-23), e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), têm sido associadas com a patogênese da infecção endodôntica (Marçal et al. 2010, Teixeira-Salum et al. 2010, Azuma et al. 2013, Cintra et al. 2016b). Entretanto, não existem estudos que relacionem a presença dessas citocinas em ratos com infecção endodôntica e portadores de IRA, para fornecer um melhor entendimento desta possível relação bidirecional.

A IL-6 é uma citocina pleomórfica que está presente em processos fisiológicos e patológicos, como a resposta ao trauma, à infecção e ao desenvolvimento e progressão da inflamação (Nibali et al. 2012). Em uma ampla revisão sistemática, foi evidenciado que a presença de IL-6 está relacionada com a patogênese de lesões periapicais (Azuma et al. 2013) e, ainda, verificou sua presença em ratos com uma ou múltiplas lesões periapicais (Cintra et al. 2016b). Por outro lado, não há na literatura informações e trabalhos que relacionem a IL-6 presente nos tecidos periapicais em função da presença da IRA.

Outra citocina pró-inflamatória, alvo de intensas pesquisas, é a IL-17, que é secretada principalmente por células T, denominadas Th 17 (Gafen 2011) e apresenta-se ativa em respostas inflamatórias, auto-imunes e antimicrobianas à patógenos em uma variedade de doenças infecciosas (Schenkein et al. 2010). Em estudo anterior, foi observada a influência da infecção endodôntica e da doença periodontal em função da diabetes na quantificação da IL-17 e sua correlação com o número de neutrófilos (Cintra et al. 2014b). Além disso, a presença desta citocina também está relacionada em função do número de dentes acometidos pela infecção endodôntica (Cintra et al. 2016b).

A IL-23 é uma citocina pró-inflamatória necessária para a diferenciação das células Th17 e consequente produção de IL-17 (Aggarwal et al. 2003). Esta citocina também foi relacionada com a presença de infecções de origem endodôntica (Cintra et al. 2016b). Foi observado que a presença de múltiplos focos de PA proporcionou um aumento do nível desta interleucina (Cintra et al. 2016b), que geralmente é expressa por monócitos ativados, macrófagos,

células dendríticas, células T, células B e células endoteliais (Oppmann et al. 2000). Além disso, a relação IL-23/IL-17 com a osteoclastogênese vem sendo descrita em algumas doenças como artrite reumatoide e a doença periodontal (Murphy et al. 2003, Silva et al. 2012). Assim, torna-se fundamental analisar estas citocinas em conjunto (IL-17 e IL-23), para verificar sua participação no desenvolvimento e manutenção das lesões periapicais induzidas em ratos portadores de IRA.

Outra citocina que também se relaciona com o processo inflamatório é o TNF- $\alpha$ , e que atua como um importante mediador de lesões teciduais (Tansey & Szymkowski 2009). Em lesões periapicais há um aumento considerável de TNF- $\alpha$  nos tecidos que circundam o elemento dentário, podendo-se supor que esta citocina pode induzir a atividade osteoclástica local (Colić et al. 2009, Silva et al. 2012, Cintra et al. 2016b). Desta forma, torna-se pertinente verificar a participação do TNF- $\alpha$  no desenvolvimento da PA em ratos portadores de IRA.

Neste contexto, a proposta geral do estudo foi avaliar a influência da IRA na severidade da PA em ratos Wistar, por meio de análises urinárias, sanguíneas, análises do perfil inflamatório e da perda de estrutura óssea periapical, além da análise de citocinas alvo desta relação.

A hipótese do presente estudo é de que a PA seria capaz de potencializar os efeitos deletérios causados pela IRA, assim como a IRA também seria capaz de potencializar os efeitos causados pela PA.

## **2- OBJETIVOS**

- Realizar a urinálise e a sedimentoscopia da urina e identificar qual ou quais parâmetros são alterados em função da presença da IRA e da PA isoladas ou associadas;

- Analisar o perfil sanguíneo, por meio do hemograma, dos níveis de creatinina, proteína sérica e uréia e identificar qual ou quais parâmetros são alterados em função da presença da IRA e da PA isoladas ou associadas;

- Verificar a presença de lesões nos rins por meio da análise histológica;

- Analisar o perfil inflamatório e a perda de estrutura óssea na PA de ratos Wistar com ou sem IRA, por meio das análises histológica, histométrica e imunohistoquímica para IL-6, IL-17, IL-23 e TNF- $\alpha$ ;

- Correlacionar os achados locais da PA com as alterações em tecido hematológico e nos exames de urina.

### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1- MATERIAL**

Foi realizado um estudo piloto com a administração intraperitoneal de Gentamicina (Gentatec®, 100 mg/Kg/dia), em dose única, durante 10 dias seguindo o modelo do estudo de Christo et al. (2011). Entretanto, ao associarmos a exposição dos molares para o desenvolvimento da periodontite apical, houve grande taxa de mortalidade dos animais. Assim, realizamos um segundo estudo piloto analisando 3 posologias utilizadas para a indução da IRA e associamos ao modelo da periodontite apical (Azuma et al. 2018, Azuma et al. 2017, Cintra et al. 2016b). Neste segundo estudo foi possível verificar que a dosagem de 100mg/kg durante 8 dias (Aygün et al. 2011, Balakumar et al. 2017, Jamshidzadeh et al. 2015, Sodimbaku et al. 2016) produziu resultados semelhantes à metodologia proposta anteriormente (100mg/kg/10 dias), e também semelhante aos resultados encontrados no estudo de Christo et al. (2011), entretanto sem mortalidade. Assim, foi possível padronizar o modelo da IRA em nosso laboratório, por meio da administração de gentamicina, para o estudo da relação bidirecional desta enfermidade com as infecções orais, particularmente com a periodontite apical (Cardoso et al. 2018 in press).

Foram utilizados 64 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 250-280g, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com quatro ratos por gaiola e alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água ad libitum, exceto 12 horas antes das intervenções e 6 horas após as intervenções. As gaiolas foram mantidas em ambiente com temperatura oscilando entre 22 e 24°C e com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro). Os procedimentos experimentais propostos neste estudo foram aprovados pelo comitê de conduta ética em experimentação animal (CEUA/Unesp 00373-2017).

Os animais ficaram em quarentena para adaptação no novo habitat e para contenção de alguma possível doença de fácil propagação. Uma semana antes do procedimento cirúrgico, os animais foram vermifugados com Ivermectina 1% via oral (0,3 ml dissolvidos em 1 litro de água) por um período de 5 dias.

O protocolo anestésico utilizado para o procedimento cirúrgico de indução da PA foi à base de Xilazina 2% (relaxante muscular, analgésico e sedativo, Xilazin, Syntec do Brasil LTDA – Cotia, São Paulo, Brasil – 10mg/ml) e à base de Cloridrato de Cetamina a 10% (Ketamina Agener 10%, União Química Farmacêutica Nacional S/A – Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil – 80mg/Kg), viaintramuscular. Para eutanásia, foi utilizado um anestésico via intraperitoneal à base de tiopental sódico (Thiopentax, Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda – Itapira, Brasil) na dosagem de 240mg por quilograma de peso corporal.

### 3.2- MÉTODOS

#### - Indução da IRA

Os animais receberam gentamicina (Gentatec®, 100 mg/Kg/dia), via intraperitoneal, por 8 dias, em dose única diária (Figura 1). Os ratos do grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento recebendo, no entanto, NaCl 0,9% (0,1 ml/100 g de peso corporal).



**Figura 1.** Administração intraperitoneal de Gentamicina para a indução da IRA.

## - Indução da PA

A exposição pulpar para indução das lesões periapicais foi realizada no mesmo dia em que os animais receberam a última dose de Gentamicina. Para isso, os ratos foram anestesiados, conforme protocolo anestésico descrito anteriormente. Em seguida, as polpas dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito foram expostas, por meio de uma broca em aço carbono (Broca Ln Long Neck- Maillefer, Dentsply) dotada de uma esfera na extremidade com 0,1mm de diâmetro. Desta forma, todas as exposições pulpares foram padronizadas com 0,1mm de diâmetro (Cintra et al. 2013a) e as polpas permaneceram expostas na cavidade bucal por um período de 15 e 30 dias, até o momento da eutanásia (Figura 2).



**Figura 2.** Protocolo anestésico utilizado e exposição dos molares para a indução da periodontite apical.

### - Divisão em grupos

Cada grupo foi composto de 16 animais de acordo com a intervenção realizada e podem ser visualizados na tabela 1.

**Tabela 1. Divisão dos diferentes grupos experimentais**

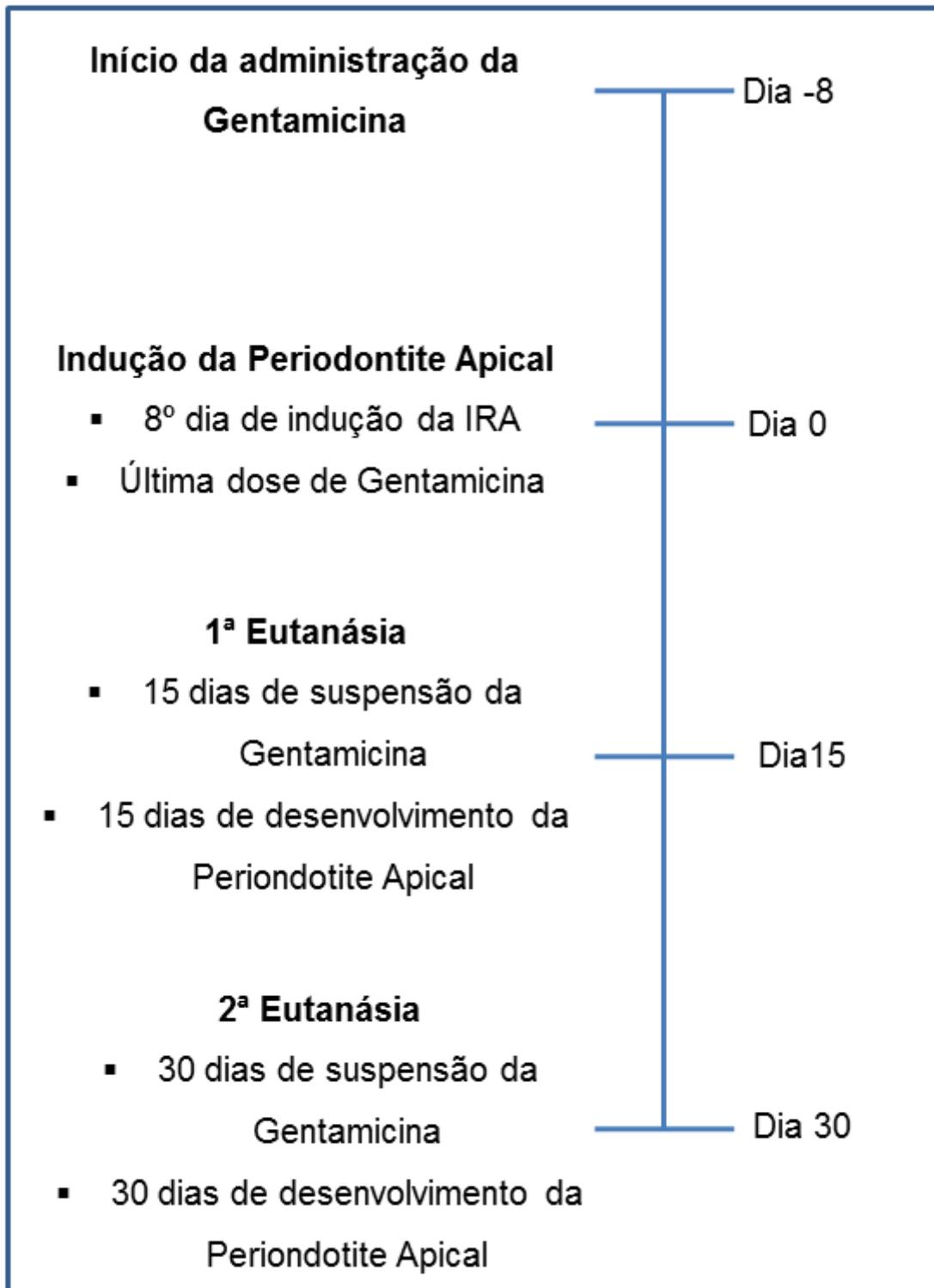
<b>Grupos</b>	<b>Descrição</b>
<b>C</b>	Ratos Controle: <ul style="list-style-type: none"><li>• Injeções subcutâneas de NaCl 0,9% (0,1 ml/100g de peso corporal) durante 8 dias.</li><li>• Anestesia para simular o mesmo stress.</li></ul>
<b>PA</b>	Ratos com PA: <ul style="list-style-type: none"><li>• Injeções subcutâneas de NaCl 0,9% (0,1 ml/100g de peso corporal) durante 8 dias.</li><li>• Exposição pulpar para indução a lesão periapical.</li></ul>
<b>IRA</b>	Ratos com IRA: <ul style="list-style-type: none"><li>• Injeções subcutâneas de Gentamicina* (100mg/kg/dia) durante 8 dias.</li><li>• Anestesia para simular o mesmo stress.</li></ul>
<b>IRA+PA</b>	Ratos com IRA e PA: <ul style="list-style-type: none"><li>• Injeções subcutâneas de Gentamicina* (100mg/kg/dia) durante 8 dias.</li><li>• Exposição pulpar para indução a lesão periapical.</li></ul>

\*Concentração de Gentamicina (Gentatec®) solução de 100mg/Kg/dia.

### - Períodos de observação

Decorridos os períodos pré-determinados de 15 e 30 dias (Christo et al. 2011), os animais foram anestesiados, conforme protocolo descrito anteriormente, e as amostras de cada tecido coletadas. Em seguida os animais foram eutanasiados com 240mg/Kg de Tiopental (Cintra et al. 2016a).

O “timeline” do experimento pode ser observado na Figura 3.



**Figura 3.** Timeline Experimental.

#### **- Coleta de amostra de urina para análise**

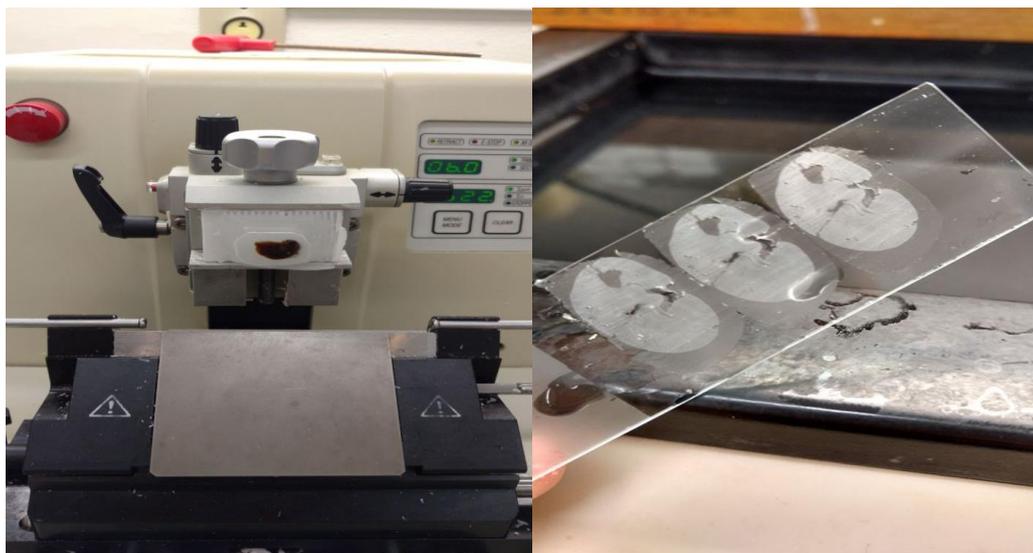
Após anestesia, amostras de 1ml de urina foram coletadas no dia da eutanásia por cistocentese e armazenadas em tubos de eppendorf. No mesmo dia, foi realizada a urinálise. O restante de urina coletada foi centrifugado para obtenção do sedimento e análise microscópica.

#### **- Coleta de amostra de tecido hematológico**

Após coleta de urina, amostras de 7ml de sangue foram coletadas por punção cardíaca e o soro e plasma obtidos a partir da centrifugação do sangue (5000 rpm/10 minutos). Logo após o experimento, foi realizado o hemograma e o soro foi armazenado à -20°C para a realização das dosagens dos níveis de creatinina, proteína sérica e ureia.

#### **- Coleta dos rins e processamento laboratorial**

Os rins direito de cada animal foram removidos e fixados em solução formalina a 10%, tamponada com pH neutro, durante as primeiras 20 horas. Em seguida foram lavados em água corrente por um período de 12 horas, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Após inclusão, foram realizados cortes teciduais semi-seriados de 6 µm de espessura, em micrótomo (Leica - RM 2045). Para cada rim, 05 lâminas com 3 cortes teciduais (Figura 4), foram preparadas e coradas com Hematoxilina e Eosina (LILLIE, 1954).



**Figura 4.** Confeção dos cortes histológicos do tecido renal.

#### **- Coleta das mandíbulas e processamento laboratorial**

Após eutanásia, as hemimandíbulas e hemimaxilas direitas foram removidas e fixadas em solução formalina a 10%, tamponada com pH neutro, durante as primeiras 20 horas e depois lavadas em água corrente por um período de 12 horas. Após a fixação, foram desmineralizadas em solução de EDTA 10%, lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Após inclusão, as peças foram cortadas com cortes semi-seriados, com 5  $\mu$ m de espessura, realizados em micrótomo (Leica - RM 2045). Para cada espécime, 05 lâminas com 3 cortes teciduais, foram preparadas e coradas com Hematoxilina e Eosina e outras 2 lâminas para cada marcador foram submetidas à técnica de imunohistoquímica (IL-6, IL-17, IL-23 e TNF- $\alpha$ ).

Para a técnica da imunohistoquímica, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em etanol. A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão Diva Decloaker® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada Decloaking Chamber® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Ao término de cada uma das etapas da reação imunohistoquímica foram efetuadas lavagens em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4. Os cortes histológicos foram imersos em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora, para bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, depois de lavagens em PBS, os cortes

foram tratados com 3% de soro albumina bovino por 12 horas para bloqueio dos sítios inespecíficos. As lâminas histológicas foram submetidas à incubação com seus respectivos anticorpos primários diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes foi empregado o Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA). As secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotilado, durante 2 horas, e posteriormente tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Na revelação foi empregado como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA) e em seguida a contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

## **4- FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS**

### **4.1- Análise das amostras de urina**

Foi coletada 1,0 mL de urina pelo método de cistocentese, acondicionada em eppendorf, identificada e submetida às análises laboratoriais. Após os exames físico e químico da urina, a amostra foi centrifugada durante cinco minutos em tubos cônicos graduados. Obteve-se o sobrenadante, ficando o sedimento com quantidade aproximada de 0,3 ml. Para o exame microscópico foram utilizadas alíquotas de 10 $\mu$ L do sedimento, entre lâmina microscópica e lamínula de 20x20mm, sem o emprego de corantes específicos para identificação dos elementos figurados da urina.

### **4.2- Análise das amostras de tecido hematológico**

Para realização do hemograma foi utilizado o aparelho ABX Vet (ABX Diagnostics) e o ABX VetPack composto por 3 reagentes. O ABX VET Pack, R3 é uma solução salina e tampão eletrolítica que permite a diluição e a preparação da amostra de sangue para análise. A presença de surfactante não iônico garante a dinâmica do fluxo em todos os sistemas hidráulicos do instrumento. A ação eletrolítica aceita a contagem das células por impedância. Este reagente diferencia populações morfológicas de leucócitos e é utilizado nos ciclos de enxágue e limpeza dos sistemas hidráulicos do instrumento. O ABX VET Pack, R2 decompõe a membrana celular dos eritrócitos. Pela adição do agente surfactante, a hemoglobina é liberada. Todo o ferro heme é oxidado e os complexos resultantes são quantificados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 530nm. O detergente presente na solução também diferencia populações morfológicas de leucócitos. ABX VET Pack, R1 utiliza a ação combinada de uma enzima proteolítica com um detergente para eliminar os resíduos de proteína e evitar que os tubos hidráulicos fiquem obstruídos e/ou bloqueiem o fluxo. Também é usado para decompor os acúmulos de proteína nas aberturas e câmaras de contagem. O volume globular foi analisado pelo método de microhematócrito e a contagem diferencial de leucócitos e análise morfológica de hemácias e leucócitos em esfregaços sanguíneos corados pelo corante Panótico rápido. Nesta análise, foram

investigados 12 parâmetros, sendo eles: Hemácias (He), Volume Globular (VG), Hemoglobina (Hb), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Leucócitos, Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos, Eosinófilos, Basófilos e Proteína Plasmática Total, utilizando o refratômetro (PTP).

Para a análise da Creatinina, ureia e proteínas totais no soro, foram utilizados kits comerciais para cada parâmetro da marca comercial Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil).

#### **4.3- Análise histológica, histométrica e imunohistoquímica**

A análise histológica dos rins foi realizada para a confirmação das lesões renais e para caracterizar o tipo de alteração observada: a) Necrose de células epiteliais; b) dilatação tubular; c) presença de células com núcleo picnótico.

A análise histológica das hemimandíbulas e hemimaxilas serviram para caracterização do perfil inflamatório das lesões periapicais (Cintra et al. 2014a). Os resultados foram expostos por meio de duas análises, sendo uma descritiva e outra qualitativa. As lâminas contendo os cortes representativos de cada espécime foram avaliadas sob a microscopia óptica e utilizadas na análise descritiva. A análise descritiva consistiu na descrição dos fenômenos histopatológicos, procurando caracterizá-los globalmente em função das variáveis experimentais (Cintra et al. 2013c).

A análise qualitativa foi realizada por meio da atribuição de escores, graduando as magnitudes dos fenômenos histopatológicos de forma dissociada e da análise histométrica das estruturas do periodonto apical (Cintra et al. 2013c). A variável estudada foi o infiltrado inflamatório, quanto à sua intensidade e extensão, e perda de estrutura óssea periapical. Foram atribuídos escores para os critérios intensidade e extensão do infiltrado inflamatório e para a perda de estrutura óssea foi realizada a mensuração por área, empregando programa de imagens específico (Leica LAS X - Leica Microsystems, Nussloch – Germany).

A intensidade do processo inflamatório foi analisada em conformidade com o número médio aproximado de células inflamatórias presentes em

diferentes campos de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400x junto ao periápice dentário. Foram considerados score 1, para células inflamatórias ausentes ou em número desprezível; score 2, para infiltrado inflamatório discreto (menos de 10 células por campo); score 3, para infiltrado inflamatório moderado (entre 10 e 25 células por campo); e score 4, para infiltrado inflamatório severo (mais que 25 células por campo).

A análise histométrica foi realizada em todos os grupos para a verificação da perda óssea de ratos em função da presença da IRA. Foi empregado o software Leica LAS X (Leica Microsystems, Nussloch – Germany) e os valores foram expressos em micrometro quadrado ( $\mu\text{m}^2$ ) obtidos em medidas de área.

A análise imunohistoquímica foi realizada sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão) por um investigador cego e calibrado. A imunomarcação foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no citoplasma das células e/ou na matriz extracelular. A análise qualitativa foi efetuada utilizando-se cinco secções histológicas de cada animal e ao padrão de imunomarcação foi atribuído em escore. O critério para o estabelecimento dos escores foi adotado de uma modificação daqueles estabelecidos por Cintra et al. (2014c) (Tabela 2).

**Tabela 2. Escores atribuídos para o padrão de imunomarcação**

<b>Escore</b>	<b>Descrição</b>
<b>0</b>	Ausência de imunomarcação;
<b>1</b>	Baixo padrão de imunomarcação;
<b>2</b>	Moderado padrão de imunomarcação;
<b>3</b>	Alto padrão de imunomarcação;
<b>4</b>	Padrão extremamente alto de imunomarcação.

### **4.3- Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada por meio do programa SigmaPlot 12.0™ (Chicago, IL, USA). A verificação da distribuição normal das variáveis contínuas quantitativas foi feita pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Para os valores quantitativos das análises que seguiram uma distribuição normal, foi aplicado o teste ANOVA, enquanto que para comparações múltiplas dos resultados entre os grupos estudados, foi utilizado o teste Tukey.

Para as análises histológica e imunohistoquímica foram atribuídos escores e para os valores quantitativos das análises que não seguiram uma distribuição normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, e quando observada alguma diferença significativa, foi realizado o cruzamento entre os grupos, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn (Dunn, 1958). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade foi menor 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5- RESULTADOS

### 5.1- Urina

A urinálise foi realizada aos 15 e 30 dias após indução da PA. Os achados no período experimental de 15 dias podem ser observados na tabela 3 e os de 30 dias na tabela 4. A informação relevante é com relação à presença de proteínas (+). Apenas um animal do grupo IRA em cada período experimental não apresentou proteínas (+). Com relação ao grupo PA, apenas dois animais de cada período experimental não apresentaram proteínas (+). Entretanto, todos os animais do grupo IRA+PA (períodos de 15 e 30 dias), apresentaram proteínas (+) na urina.

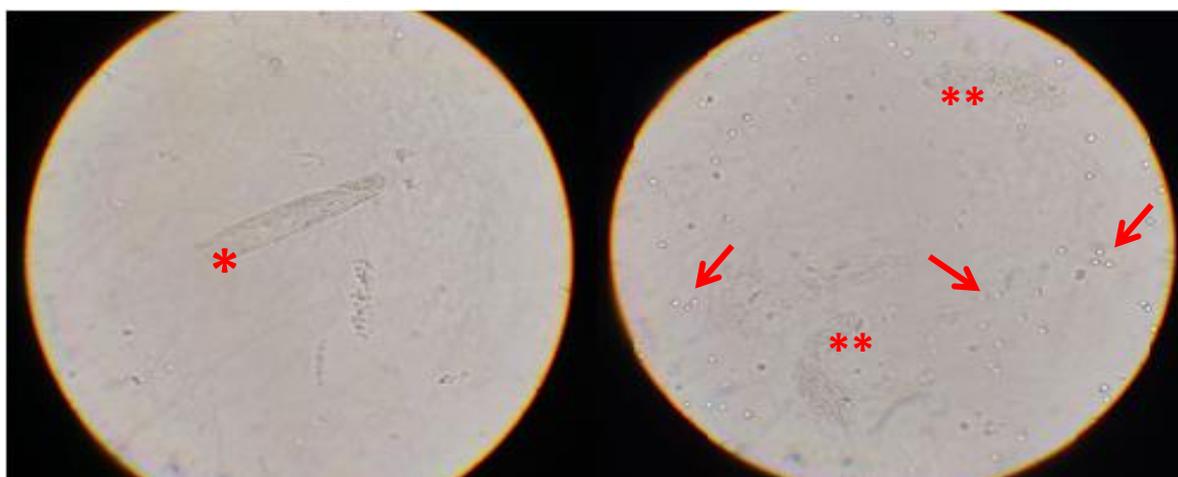
**Tabela 3.** Características da urinálise dos quatro grupos no período de 15 dias.

Grupos	Volume (média)	Cor	Aspecto	pH	Leucócitos	Sangue oculto	Proteína
C	1,012	Amarelo Claro (7/8)	Ligeiramente Turva (7/8)	8 (5/8)	3+ (2/8)	4+ (7/8)	2+ (1/8)
		Amarelo Citrino (1/8)	Turva (1/8)	7 (3/8)	2+ (1/8)	2+ (1/8)	1+ (3/8)
PA	1,01	Amarelo Claro (6/8)	Ligeiramente Turva (7/8)	8 (6/8)	2+ (5/8)	4+ (5/8)	2+ (1/8)
		Amarelo Citrino (2/8)	Turva (1/8)	7 (2/8)	1+ (3/8)	3+ (2/8)	1+ (5/8)
				6 (2/8)		1+ (1/8)	0 (2/8)
IRA	1,05	Amarelo Claro (8/8)	Ligeiramente Turva (7/8)	8 (3/8)	3+ (1/8)	4+ (5/8)	1+ (7/8)
			Turva (1/8)	7 (1/8)	2+ (6/8)	3+ (2/8)	0 (1/8)
				6 (2/8)	1+ (1/8)	1+ (1/8)	
				5 (2/8)			
IRA+PA	1,275	Amarelo Claro (5/8)	Ligeiramente Turva (6/8)	7 (3/8)	2+ (5/8)	4+ (5/8)	1+ (8/8)
		Amarelo Citrino (3/8)	Turva (2/8)	6 (3/8)	1+ (3/8)	3+ (2/8)	
				5 (2/8)		1+ (1/8)	

**Tabela 4.** Características da urinálise dos quatro grupos no período de 30 dias.

Grupos	Volume (média)	Cor	Aspecto	pH	Leucócitos	Sangue oculto	Proteína
<b>N</b>	1,062	Amarelo Claro (6/8)	Ligeiramente Turva (8/8)	8 (6/8)	3+ (1/8)	4+ (7/8)	1+ (3/8)
		Amarelo Citrino (2/8)		7 (2/8)	2+ (1/8) 1+ (4/8) 0 (4/8)	0 (1/8)	0 (5/8)
<b>PA</b>	1,012	Amarelo Claro (2/8)	Ligeiramente Turva (8/8)	8 (5/8)	2+ (4/8)	4+ (5/8)	1+ (6/8)
		Amarelo Citrino (3/8)		7 (3/8)	1+ (4/8)	3+ (1/8) 2+ (2/8)	0 (2/8)
<b>IRA</b>	1,125	Amarelo Claro (2/8)	Ligeiramente Turva (5/8)	8 (4/8)	3+ (2/8)	4+ (6/8)	3+ (1/8)
		Amarelo Citrino (2/8)	Turva (3/8)	6 (2/8)	2+ (5/8)	3+ (1/8)	1+ (6/8)
				5 (2/8)	1+ (1/8)	1+ (1/8)	0 (1/8)
<b>IRA+PA</b>	1,43	Amarelo Claro (5/8)	Ligeiramente Turva (4/8)	7 (5/8)	3+ (5/8)	4+ (7/8)	3+ (1/8)
		Amarelo Citrino (2/8)	Turva (4/8)	6 (3/8)	2+ (3/8)	3+ (1/8)	2+ (1/8) 1+ (6/8)

A sedimentoscopia foi realizada de forma observacional aos 15 e 30 dias. Todos os animais portadores de IRA (grupos IRA e IRA+PA), de ambos os períodos, apresentaram componentes que condizem com a presença da disfunção renal aguda, como a presença de cilindros granulosos, sedimentos de carbonato de cálcio e fosfato amorfo. Tais achados microscópicos podem ser observados na figura 5.



**Figura 5.** Análise microscópica dos sedimentos encontrados na urina dos animais com IRA. Cilindros granulosos (\*), fosfato amorfo (\*\*) e carbonato de cálcio (setas).

## 5.2- Tecido hematológico

Os resultados do hemograma de ambos os períodos experimentais (15 e 30 dias) são apresentados na Tabela 5. Com relação à série vermelha, foi observada uma redução no número de hemácias, hemoglobina e no volume globular nos grupos IRA e IRA+PA ( $p < 0,05$ ) de ambos os períodos experimentais (15 e 30 dias), entretanto, sem apresentarem diferenças significativas entre si ( $p > 0,05$ ). O volume corpuscular médio (VCM) apresentou um valor significativamente reduzido aos 15 dias no grupo IRA+PA, quando comparado aos outros grupos ( $p < 0,05$ ), no entanto sem diferenças aos 30 dias ( $p > 0,05$ ).

Tanto a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) como as proteínas plasmáticas totais (PTP) não apresentaram diferenças estatísticas entre os quatro grupos experimentais em ambos os períodos experimentais ( $p > 0,05$ ).

Entre as células inflamatórias, foi observado um aumento significativo no número de leucócitos nos grupos PA, IRA e IRA+PA aos 15 e 30 dias, comparados ao controle ( $p < 0,05$ ). Ainda, observou-se que os grupos IRA e IRA+PA tiveram um aumento ainda maior comparado ao grupo PA apenas no período de 15 dias ( $p < 0,05$ ).

Em relação aos valores de neutrófilos, aos 15 dias observou-se aumento nos grupos IRA e IRA+PA comparados ao controle ( $p < 0,05$ ), entretanto semelhantes ao grupo PA ( $p > 0,05$ ). Já aos 30 dias não houve diferenças entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Os linfócitos estiveram aumentados nos grupos PA, IRA e IRA+PA em ambos os períodos experimentais quando comparados ao controle ( $p < 0,05$ ) e sem diferenças entre si ( $p < 0,05$ ).

Os valores obtidos para monócitos, eosinófilos e basófilos não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 5.** Média e desvio padrão dos parâmetros sanguíneos de ambos os períodos experimentais de todos os grupos.

Parâmetros Sanguíneos	Grupos							
	15 dias				30 dias			
	C	PA	IRA	IRA+PA	C	PA	IRA	IRA+PA
He ( $10^6/\mu\text{L}$ )	6.47 ± 0.23 <sup>a</sup>	6.60 ± 0.24 <sup>a</sup>	5.73 ± 0.35 <sup>b</sup>	5.96 ± 0.65 <sup>b</sup>	6.89 ± 0.21 <sup>a</sup>	6.73 ± 0.30 <sup>a</sup>	6.15 ± 0.40 <sup>b</sup>	6.36 ± 0.37 <sup>b</sup>
Hb (g/dL)	14.76 ± 0.46 <sup>a</sup>	15.09 ± 0.58 <sup>a</sup>	13.01 ± 1.08 <sup>b</sup>	13.36 ± 1.60 <sup>b</sup>	15.16 ± 0.77 <sup>a</sup>	15.03 ± 0.65 <sup>a</sup>	13.80 ± 0.99 <sup>b</sup>	14.14 ± 0.66 <sup>b</sup>
VG (%)	44.25 ± 1.39 <sup>a</sup>	45.25 ± 1.67 <sup>a</sup>	39.38 ± 2.83 <sup>b</sup>	40.63 ± 4.47 <sup>b</sup>	45.75 ± 1.49 <sup>a</sup>	45.25 ± 1.16 <sup>a</sup>	41.56 ± 3.16 <sup>b</sup>	42.50 ± 2.12 <sup>b</sup>
VCM (fL)	68.80 ± 1.03 <sup>a</sup>	68.56 ± 0.53 <sup>b</sup>	68.42 ± 0.99 <sup>ab</sup>	67.45 ± 1.13 <sup>c</sup>	66.42 ± 1.34 <sup>a</sup>	67.28 ± 1.6 <sup>a</sup>	67.79 ± 1.74 <sup>a</sup>	68.05 ± 1.47 <sup>a</sup>
CHCM (%)	33.37 ± 0.48 <sup>a</sup>	33.34 ± 0.30 <sup>a</sup>	33.72 ± 0.24 <sup>a</sup>	33.42 ± 0.33 <sup>a</sup>	33.13 ± 0.74 <sup>a</sup>	33.19 ± 0.71 <sup>a</sup>	33.32 ± 0.56 <sup>a</sup>	33.17 ± 0.73 <sup>a</sup>
PTP (g/dL)	6.24 ± 0.45 <sup>a</sup>	6.71 ± 0.31 <sup>a</sup>	6.34 ± 0.65 <sup>a</sup>	6.24 ± 0.59 <sup>a</sup>	6.80 ± 0.40 <sup>a</sup>	6.80 ± 0.30 <sup>a</sup>	6.70 ± 0.30 <sup>a</sup>	6.94 ± 0.21 <sup>a</sup>
Leucócitos ( $10^2/\mu\text{L}$ )	81.63 ± 7.00 <sup>a</sup>	93.75 ± 9.14 <sup>b</sup>	104.00 ± 10.83 <sup>c</sup>	117.18 ± 7.23 <sup>c</sup>	84.25 ± 4.98 <sup>a</sup>	100.50 ± 16.27 <sup>b</sup>	101.88 ± 3.60 <sup>b</sup>	92.88 ± 12.66 <sup>b</sup>
Neutrófilos ( $10^2/\mu\text{L}$ )	16.00 ± 2.40 <sup>a</sup>	20.75 ± 5.34 <sup>ab</sup>	24.01 ± 7.88 <sup>b</sup>	25.07 ± 5.09 <sup>b</sup>	19.39 ± 3.92 <sup>a</sup>	23.41 ± 8.33 <sup>a</sup>	20.73 ± 5.00 <sup>a</sup>	19.84 ± 5.67 <sup>a</sup>
Linfócitos ( $10^2/\mu\text{L}$ )	61.18 ± 5.04 <sup>a</sup>	69.12 ± 5.10 <sup>b</sup>	68.99 ± 6.66 <sup>b</sup>	69.69 ± 4.90 <sup>b</sup>	58.44 ± 7.79 <sup>a</sup>	73.22 ± 6.79 <sup>b</sup>	74.04 ± 7.22 <sup>b</sup>	71.49 ± 5.65 <sup>b</sup>
Monócitos ( $10^2/\mu\text{L}$ )	2.80 ± 1.79 <sup>a</sup>	2.76 ± 1.55 <sup>a</sup>	2.74 ± 0.81 <sup>a</sup>	2.84 ± 0.65 <sup>a</sup>	3.14 ± 2.11 <sup>a</sup>	4.08 ± 1.834 <sup>a</sup>	3.26±3.3 2 <sup>a</sup>	1.90 ± 0.99 <sup>a</sup>
Eosinófilos	1.09 ± 1.38 <sup>a</sup>	1.12 ± 0.99 <sup>a</sup>	1.05 ± 1.55 <sup>a</sup>	1.10 ± 0.82 <sup>a</sup>	1.25 ± 1.17 <sup>a</sup>	1.76 ± 2.42 <sup>a</sup>	1.90 ± 1.37 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.63 <sup>a</sup>
Basófilos	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>

\* Letras iguais na mesma linha demonstram ausência de diferença estatística entre os grupos ( $p > 0.05$ ).

Legendas: Hemácias (He), Volume Globular (VG), Hemoglobina (Hb), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Leucócitos, Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos, Eosinófilos, Basófilos e Proteína Plasmática Total (PTP).

A mensuração dos parâmetros aos 15 e 30 dias para os biomarcadores creatinina, proteína e ureia estão apresentados na Tabela 6.

Pode-se observar nos ratos com insuficiência renal aguda (grupos IRA e IRA+PA) aumento de uréia comparado aos grupos controle e PA ( $p < 0,05$ ) nos dois períodos experimentais. A creatinina sérica foi estatisticamente mais elevada em IRA e IRA+PA quando comparado aos grupos controle e PA ( $p < 0,05$ ) no período de 15 dias. No entanto, no período de 30 dias, a diferença estatística foi observada apenas no grupo IRA+PA, comparado aos grupos controle e PA ( $p < 0,05$ ). O nível de proteína sérica foi estatisticamente menor nos grupos PA, IRA e IRA+PA aos 15 e 30 dias ( $p < 0,05$ ). Entretanto, esses três grupos não apresentaram diferenças estatísticas entre si ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 6.** Média e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos no soro de ambos os períodos experimentais de todos os grupos.

Análises Bioquímicas	Grupos							
	15 dias				30 dias			
	C	PA	IRA	IRA+PA	C	PA	IRA	IRA+PA
<b>Uréia (mg/dL)</b>	57.19 ± 9.56 <sup>a</sup>	55.06 ± 5.30 <sup>a</sup>	83.5 ± 12.66 <sup>b</sup>	79.31 ± 11.89 <sup>b</sup>	50.31 ± 4.44 <sup>a</sup>	50.63 ± 5.21 <sup>a</sup>	62.44 ± 13.59 <sup>b</sup>	60.63 ± 9.56 <sup>b</sup>
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0.61 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.23 <sup>b</sup>	0.81 ± 0.19 <sup>b</sup>	0.60 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.14 <sup>ab</sup>	0.69 ± 0.11 <sup>b</sup>
<b>Proteína (g/dL)</b>	7.24 ± 0.83 <sup>a</sup>	6.53 ± 0.40 <sup>b</sup>	6.06 ± 0.53 <sup>b</sup>	6.11 ± 0.31 <sup>b</sup>	7.31 ± 0.71 <sup>a</sup>	6.64 ± 0.42 <sup>b</sup>	6.74 ± 0.39 <sup>b</sup>	6.52 ± 0.63 <sup>b</sup>

\* Letras iguais na mesma linha demonstram ausência de diferença estatística entre os grupos ( $p > 0.05$ ).

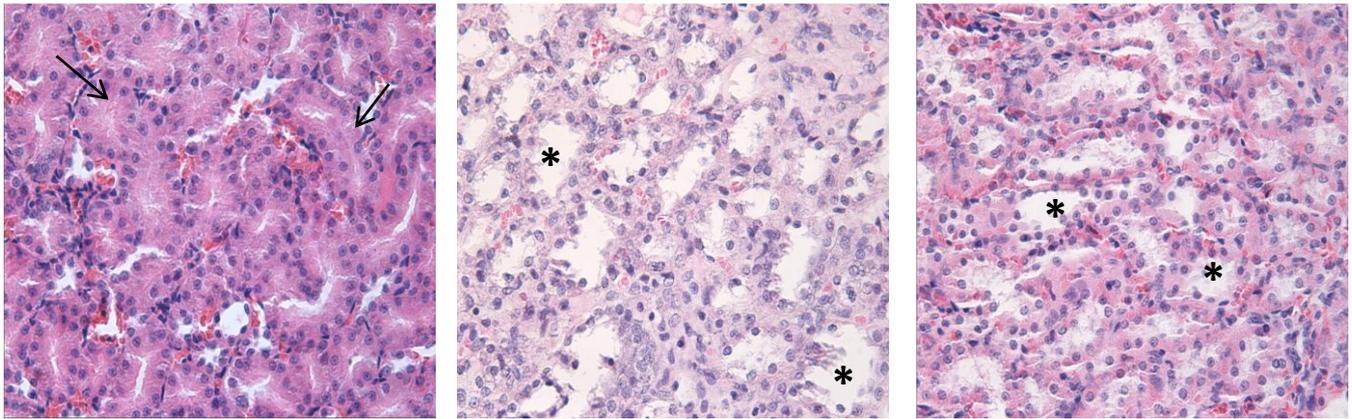
### 5.3- Rins

A análise do tecido renal foi realizada aos 15 e 30 dias da indução da PA para a confirmação da IRA. O efeito da gentamicina, droga empregada para a indução da doença, foi investigado, e, em seguida, comparado aos demais grupos. As alterações macroscópicas dos rins de ratos normais e doentes (15 e 30 dias) podem ser observadas na figura 6. Já as alterações microscópicas do tecido renal podem ser observadas na figura 7. Nos rins do grupo C foram

observadas características de normalidade com túbulos proximais com ausência de dilatação. No grupo IRA aos 15 dias foram observados túbulos dilatados contendo células epiteliais que necrosaram e que permaneceram em sua luz, além da presença de células com núcleos picnóticos. No período experimental de 30 dias, os rins dos animais com IRA apresentaram as mesmas características microscópicas encontradas nos rins dos animais do primeiro período experimental, entretanto, a dilatação tubular foi menos acentuada. Desta forma, tanto macro quanto microscopicamente foi possível observar as diferenças entre o tecido renal de animais sadios e doentes.



**Figura 6.** Imagem macroscópica do rim: à esquerda, rim de animal do grupo C; seguido pelo rim de animal portador de IRA após 15 dias de desenvolvimento da doença; e, à direita, rim de animal portador de IRA após 30 dias de desenvolvimento da doença.



**Controle**

**IRA-15 dias**

**IRA-30 dias**

**Figura 7.** Coloração em HE dos rins. Grupo C com a presença de túbulos proximais normais (setas); grupo IRA-15 dias com a presença de dilatação tubular com células epiteliais necrosadas (\*); grupo IRA - 30 dias com a presença de dilatação tubular com células epiteliais necrosadas (\*). Magnificação de 400x.

## 5.4 – Periodontite Apical

### 5.4.1 – Análise Histológica

A análise histológica das lesões periapicais foi realizada por meio da análise descritiva dos fenômenos histopatológicos, pela atribuição de scores ao infiltrado inflamatório e pela análise histométrica, correspondente a área de reabsorção óssea junto ao periápice (em micrometros quadrados) em todos os animais aos 15 e 30 dias da indução da PA. As imagens correspondentes aos cortes histológicos podem ser observadas na Figura 8. Os scores atribuídos, assim como a análise histométrica se apresentam na tabela 7.

#### Grupo Controle

No grupo C, observou-se tecido pulpar com aspectos de normalidade denotando homeostasia pulpar. A pré-dentina e a dentina apresentaram-se íntegras e dispostas em continuidade com a camada de odontoblastos, também organizada. Poucas células inflamatórias estavam dispersas e, ao acaso, caracterizando ausência de inflamação. Os vasos sanguíneos apresentavam-se congestionados e a densidade do fibrosamento caracterizou polpa jovem. O cemento, ligamento e osso alveolar apresentaram-se íntegros e

isentos de processo inflamatório ou reabsorção patológica. A inserção conjuntiva e o epitélio juncional demonstraram aspectos de normalidade e integridade tecidual. Este grupo serviu de parâmetro para a análise dos demais grupos onde o comprometimento das estruturas dentárias e de sustentação foram avaliados.

### **Grupo PA**

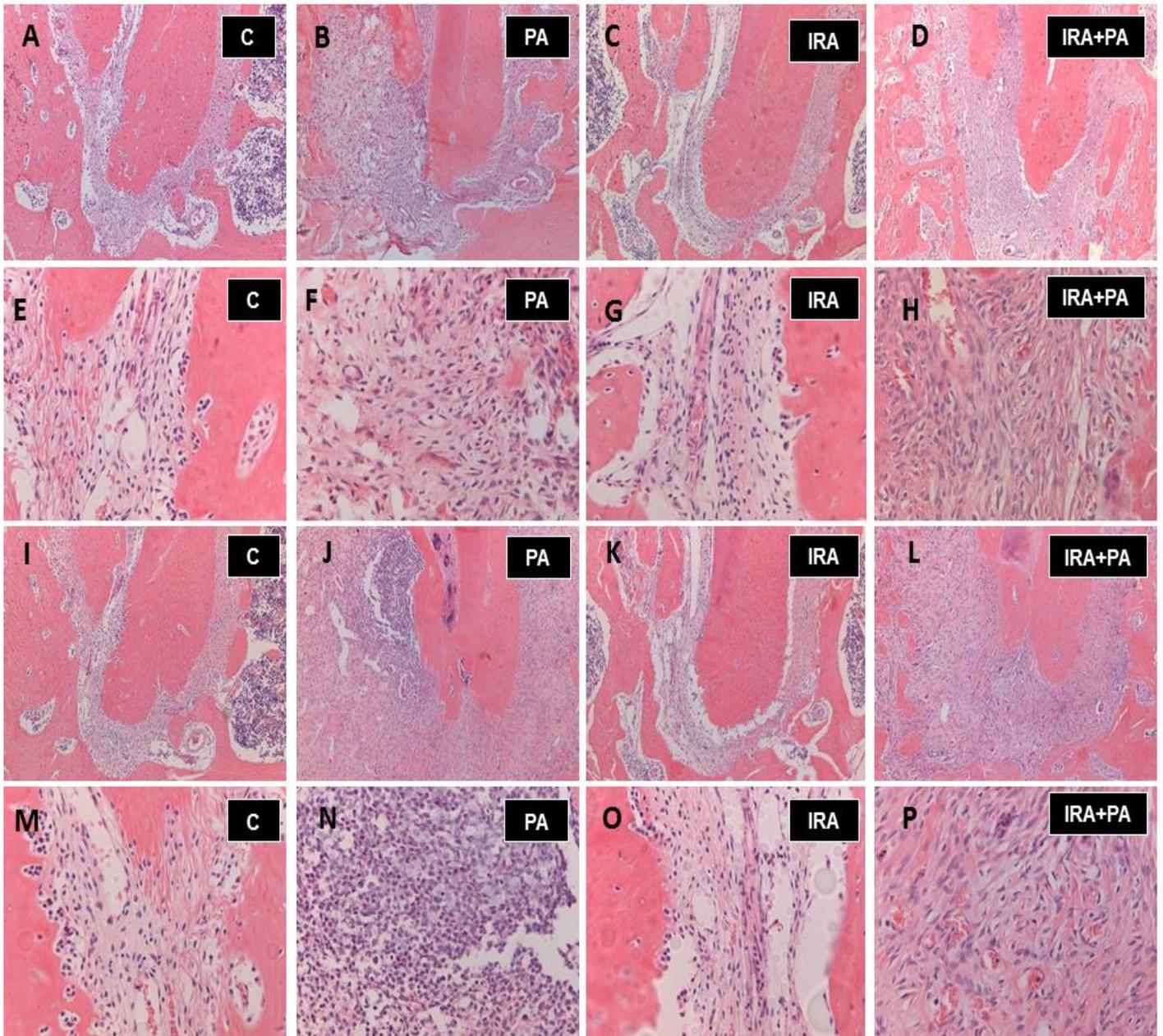
Pôde-se observar em todos os espécimes deste grupo a presença de tecido necrosado em toda a cavidade pulpar com extensão ao periápice dentário. No período de 15 dias, observou-se infiltrado inflamatório discreto em 4 espécimes e moderado nos outros 4. A perda óssea média neste período foi de  $42,95 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ . No período de 30 dias, houve a predominância do infiltrado inflamatório do tipo severo em 6 dos 8 espécimes, sendo os outros 2, infiltrado inflamatório moderado. Neste período, a perda óssea na região periapical foi de  $61,84 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ . A região do ligamento periodontal, junto ao vértice apical, apresentou-se desorganizada, com presença de tecido necrosado e inflamação subjacente em todos os casos. Todas as lesões encontradas foram de características compatíveis com granuloma periapical com origem devido à necrose pulpar.

### **Grupo IRA**

Assim como no grupo C, observou-se tecido pulpar com aspectos de normalidade denotando homeostasia pulpar. A pré-dentina e a dentina apresentaram-se íntegras e dispostas em continuidade com a camada de odontoblastos, também organizada. Poucas células inflamatórias estavam dispersas e, ao acaso, caracterizando ausência de inflamação. Os vasos sanguíneos apresentavam-se congestos e a densidade do fibrosamento caracterizou polpa jovem. O cimento, ligamento e osso alveolar apresentaram-se íntegros e isentos de processo inflamatório ou reabsorção patológica. A inserção conjuntiva e o epitélio juncional demonstraram aspectos de normalidade e integridade tecidual.

## **Grupo IRA+PA**

Pôde-se observar em todos os espécimes analisados presença de tecido necrosado em toda a cavidade pulpar com extensão ao periápice dentário. No período de 15 dias, observou-se a predominância de infiltrado inflamatório discreto em todos os espécimes. A perda óssea média neste período foi de  $18,54 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ . No período de 30 dias, houve a predominância do infiltrado inflamatório do tipo discreto em 4 espécimes, 2 casos de infiltrado inflamatório moderado e 2 casos severo. Neste período, a perda óssea na região periapical foi de  $47,86 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ . A região do ligamento periodontal, junto ao vértice apical, apresentou-se desorganizada, com presença de tecido necrosado e inflamação subjacente em todos os casos. Todas as lesões encontradas foram de características compatíveis com granuloma periapical com origem devido à necrose pulpar.



**Figura 8.** Fotomicrografias representativas de todos os grupos experimentais. A-H, correspondentes ao primeiro período experimental. I-P, correspondentes ao segundo período experimental. Coloração em H.E. Magnificação de 100x (A-D e I-L) e 400x (E-H e M-P).

**Tabela 7.** Mediana dos scores atribuídos para análise histológica de ambos os períodos experimentais de todos os grupos.

Parâmetros Histológicos	Grupos e tempos experimentais							
	15 dias				30 dias			
Intensidade do infiltrado inflamatório	C	PA	IRA	IRA+PA	C	PA	IRA	IRA+PA
<b>1: ausente</b>	8/8	0/8	8/8	0/8	8/8	0/8	8/8	0/8
<b>2: discreto</b>	0/8	4/8	0/8	8/8	0/8	0/8	0/8	4/8
<b>3: moderado</b>	0/8	4/8	0/8	0/8	0/8	2/8	0/8	2/8
<b>4: severo</b>	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	6/8	0/8	2/8
<b>Mediana*</b>	1 <sup>a</sup>	2,5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>c</sup>	1 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>c</sup>
<b>Análise estatística Teste de Kruskal Wallis</b>	P = <0.001				P = <0.001			

\*Letras iguais nas colunas indicam a ausência de diferenças estatísticas entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

### Comparação entre os grupos

Com relação ao infiltrado inflamatório, no primeiro período experimental (15 dias), o grupo PA apresentou infiltrado inflamatório variando de discreto a moderado, enquanto IRA+PA apresentou infiltrado inflamatório discreto, porém sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ). No período experimental de 30 dias, o grupo PA apresentou infiltrado inflamatório predominantemente severo enquanto o grupo IRA+PA apresentou infiltrado inflamatório predominantemente discreto e com diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Com relação à análise histométrica (tabela 8), no período experimental de 15 dias, a área de reabsorção óssea foi maior no grupo PA quando comparado ao grupo IRA+PA, com diferenças estatísticas significantes entre eles ( $p < 0,05$ ). No período experimental de 30 dias, os grupos PA e IRA+PA não apresentaram diferenças estatísticas quanto à área óssea perdida ( $p > 0,05$ ), embora a reabsorção óssea do grupo PA tenha se demonstrado um pouco maior.

**Tabela 8.** Valores médios de área ( $\times 10^4 \mu\text{m}^2$ ) e percentual de perda óssea para análise histométrica de ambos os períodos experimentais de todos os grupos.

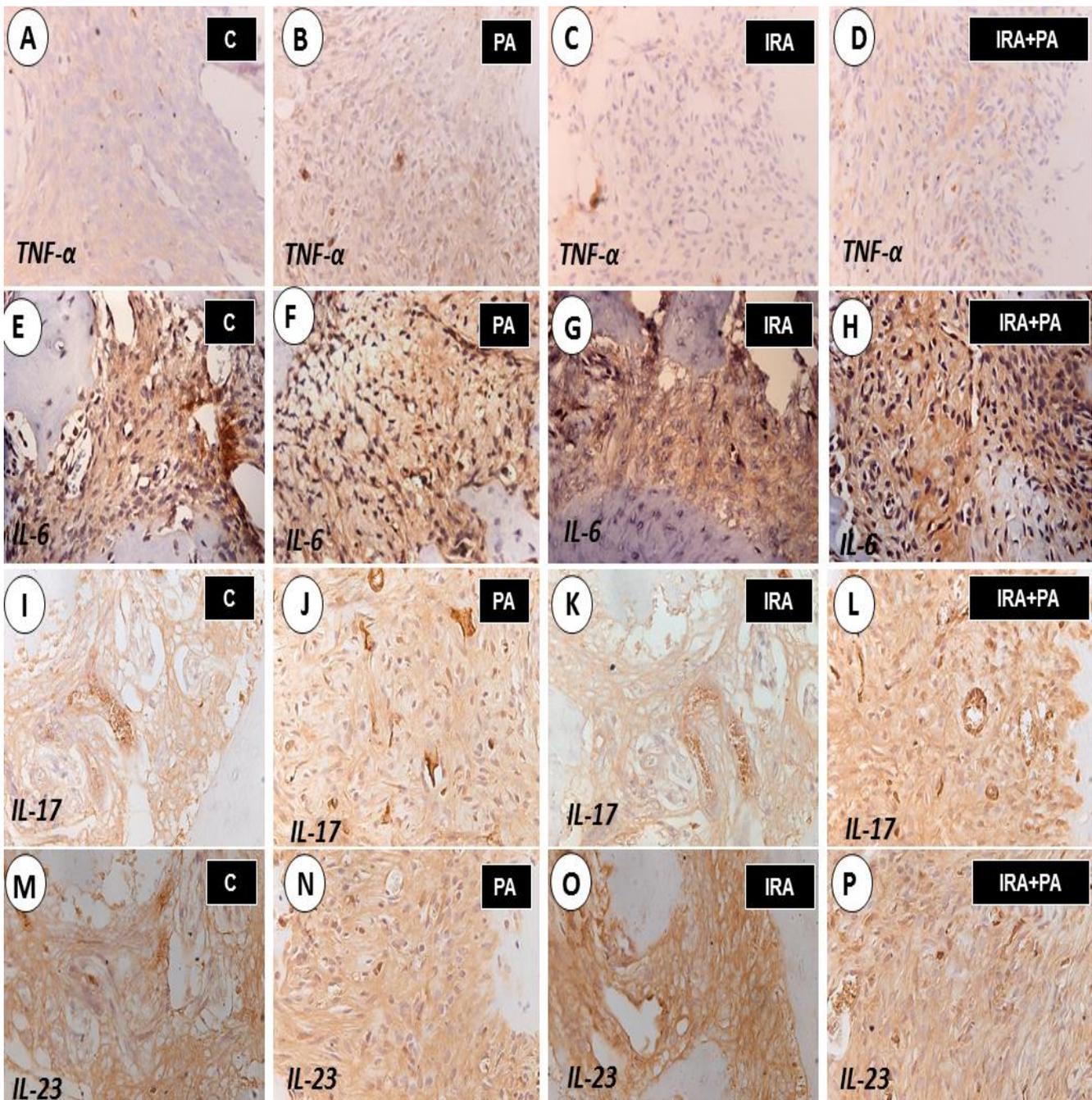
Grupos	Tempos experimentais			
	15 dias		30 dias	
	Área $\times 10^4 \mu\text{m}^2$ (Média $\pm$ DP)	%	Área $\times 10^4 \mu\text{m}^2$ (Média $\pm$ DP)	%
C	5,40 $\pm$ 2,7 <sup>a</sup>	3,83	5,39 $\pm$ 2,81 <sup>a</sup>	3,82
PA	42,95 $\pm$ 18,16 <sup>b</sup>	37,54	61,84 $\pm$ 13,69 <sup>b</sup>	43,84
IRA	5,37 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	3,81	5,37 $\pm$ 2,36 <sup>a</sup>	3,81
IRA+PA	18,54 $\pm$ 60,22 <sup>c</sup>	13,14	47,86 $\pm$ 15,24 <sup>b</sup>	33,93
<b>Análise estatística</b>	P= <0.001		P= 0.093	

\*Letras iguais nas colunas indicam a ausência de diferenças estatísticas entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

#### 5.4.2 – Análise Imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica foi realizada aos 15 e 30 dias da indução da PA para os seguintes imunomarcadores: TNF-alfa, IL-6, IL-17 e IL-23. Os cortes teciduais correspondentes ao período experimental de 15 dias podem ser observados na figura 9, e os scores correspondentes na tabela 9.

Com relação ao TNF- $\alpha$ , observou-se padrão de imunomarcacão variando de alto a extremamente alto no grupo PA e predominantemente baixo a moderado em IRA+PA ( $p < 0,05$ ). Já IL-23 apresentou padrão de imunomarcacão extremamente alto de forma predominante no grupo PA e padrão alto no grupo IRA+PA ( $p < 0,05$ ). Para IL-6 e IL-17 não houve diferenças estatísticas entre os grupos PA e IRA+PA ( $p > 0,05$ ).



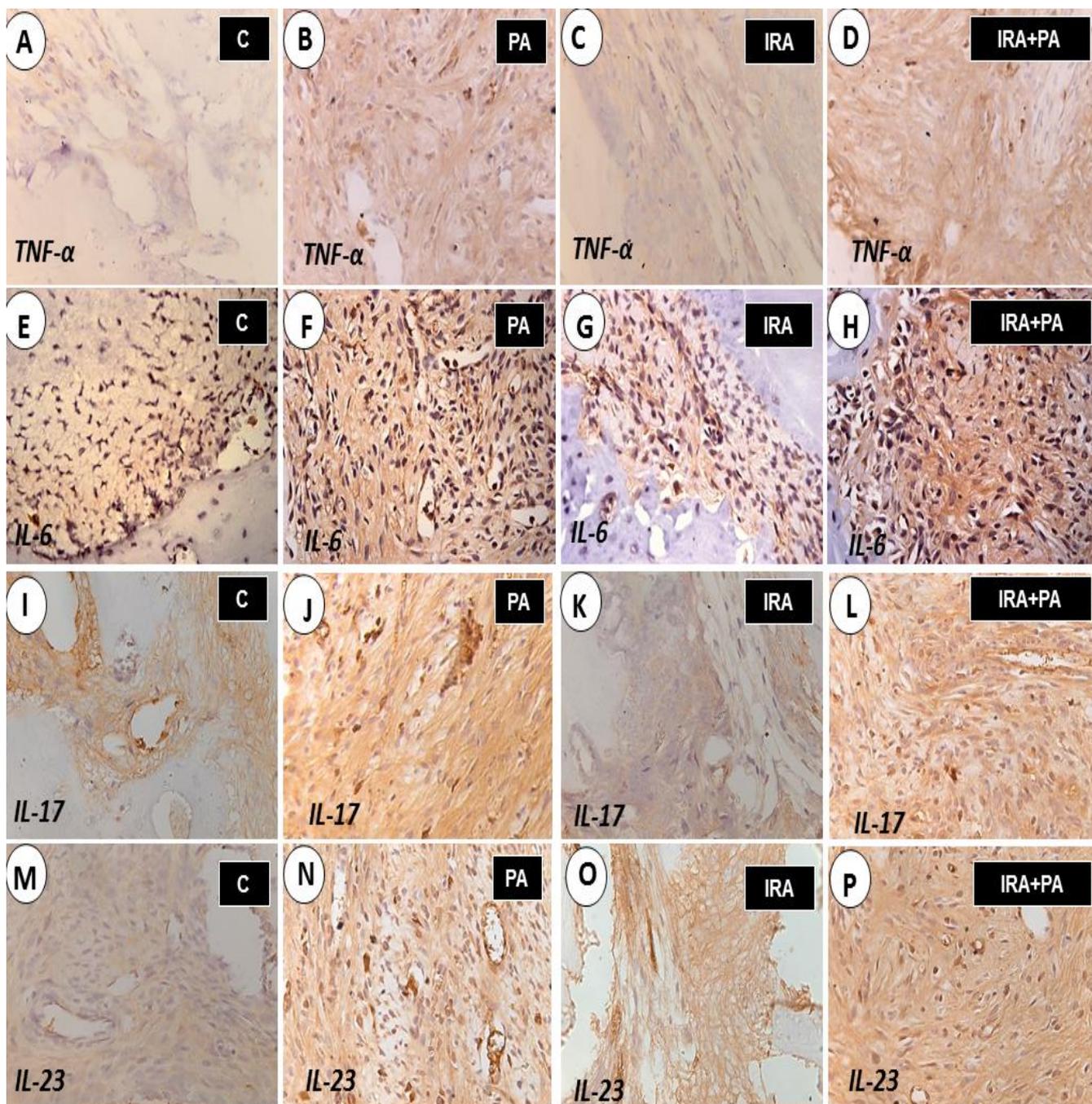
**Figura 9.** Fotomicrografias representativas dos grupos experimentais submetidos à técnica de imunohistoquímica no primeiro período experimental. A-D correspondem a imunomarcção do TNF-  $\alpha$ ; E-H correspondem a IL-6; I-L correspondem a IL-7; e M-O corresponde a IL-23. Magnificação de 400x.

**Tabela 9.** Scores e medianas atribuídos ao primeiro período experimental (15 dias), para a imunomarcção das interleucinas 6, 17, 23 e TNF- $\alpha$  de todos os grupos.

Análise Imunohistoquímica		C	PA	IRA	IRA+PA	
<b>Scores</b>						
1	<b>IL-6</b>	0/8	0/8	0/8	0/8	P = 0.959
2		8/8	2/8	8/8	3/8	
3		0/8	6/8	0/8	4/8	
4		0/8	0/8	0/8	1/8	
<b>Mediana*</b>		2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	
<hr/>						
1	<b>IL-17</b>	8/8	0/8	8/8	0/8	P = 0.234
2		0/8	0/8	0/8	0/8	
3		0/8	3/8	0/8	6/8	
4		0/8	5/8	0/8	2/8	
<b>Mediana*</b>		1 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	
<hr/>						
1	<b>IL-23</b>	8/8	0/8	8/8	0/8	P = 0.038
2		0/8	0/8	0/8	0/8	
3		0/8	3/8	0/8	8/8	
4		0/8	5/8	0/8	0/8	
<b>Mediana*</b>		1 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	3 <sup>c</sup>	
<hr/>						
1	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	8/8	0/8	8/8	2/8	P = 0.002
2		0/8	0/8	0/8	3/8	
3		0/8	4/8	0/8	3/8	
4		0/8	4/8	0/8	0/8	
<b>Mediana*</b>		1 <sup>a</sup>	3,5 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	2,5 <sup>c</sup>	

\*Letras iguais nas colunas indicam a ausência de diferenças estatísticas entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Os cortes correspondentes ao período experimental de 30 dias podem ser observados na figura 10, e os scores correspondentes na tabela 10. Os grupos IRA e IRA+PA não apresentaram diferenças em relação ao padrão de imunomarcção das interleucinas 6, 17 e 23 ( $p > 0,05$ ). Com relação ao TNF- $\alpha$ , este imunomarcador apresentou padrão de imunomarcção variando de alto a extremamente alto no grupo PA e predominantemente baixo a moderado em IRA+PA em ambos os períodos experimentais ( $p < 0,05$ ).



**Figura 10.** Fotomicrografias representativas de todos os grupos experimentais submetidos à técnica de imunohistoquímica no segundo período experimental.. A-D correspondem a imunomarcagem do TNF-  $\alpha$ ; E-H correspondem a IL-6; I-L correspondem a IL-7; e M-O corresponde a IL-23. Magnificação de 400x.

**Tabela 10.** Scores e medianas atribuídos ao segundo período experimental (30 dias), para a imunomarcção das interleucinas 6, 17, 23 e TNF- $\alpha$  de todos os grupos.

Análise Imunohistoquímica		C	PA	IRA	IRA+PA	
<b>Scores</b>						
1	<b>IL-6</b>	0/8	0/8	0/8	0/8	P = 0.082
2		8/8	1/8	8/8	4/8	
3		0/8	6/8	0/8	4/8	
4		0/8	1/8	0/8	0/8	
<b>Mediana*</b>		2 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>b</sup>	
<hr/>						
1	<b>IL-17</b>	8/8	0/8	8/8	0/8	P = 0.442
2		0/8	0/8	0/8	0/8	
3		0/8	1/8	0/8	3/8	
4		0/8	7/8	0/8	5/8	
<b>Mediana*</b>		1 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	
<hr/>						
1	<b>IL-23</b>	8/8	0/8	8/8	0/8	P = 0.234
2		0/8	0/8	0/8	0/8	
3		0/8	0/8	0/8	3/8	
4		0/8	8/8	0/8	5/8	
<b>Mediana*</b>		1 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	
<hr/>						
1	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	4/8	0/8	4/8	1/8	P = 0.021
2		4/8	0/8	4/8	1/8	
3		0/8	2/8	0/8	5/8	
4		0/8	6/8	0/8	1/8	
<b>Mediana*</b>		1,5 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	1,5 <sup>a</sup>	3 <sup>c</sup>	

\*Letras iguais nas colunas indicam a ausência de diferenças estatísticas entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

## 6- DISCUSSÃO

Neste estudo empregamos o modelo da periodontite apical induzida por meio da exposição pulpar de molares de ratos, permitindo o desenvolvimento da infecção bacteriana a partir do ambiente oral (Cintra et al. 2013, Cintra et al. 2014). As polpas ficaram expostas em meio bucal pelos períodos de 15 dias e 30 dias. Apesar do período clássico para o estudo da PA ser de 4 semanas ou 30 dias, consideramos o período de 15 dias importante para o estudo da IRA (Christo et al. 2011). Assim, foi possível verificar a relação bidirecional entre a PA e a IRA em dois períodos de tempo.

A gentamicina é um antibiótico aminoglicosídeo que é comumente usado para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias gram-negativas. No entanto, o uso frequente de gentamicina é contra-indicado devido ao seu alto poder nefrotóxico (Balakumar et al. 2017). A administração de altas doses de gentamicina (40mg/kg ou mais) é um dos pré-requisitos para indução de disfunção renal e nefrotóxica aguda em animais (Mingeot-Leclercq & Tulkens 1999, Abdel-Raheem et al. 2009). No presente estudo, foi empregada uma dose de Gentamicina (100mg/kg) administrada em ratos por 8 dias para induzir lesão renal aguda (Stojiljkovic et al. 2008, Stojiljkovic et al. 2009, Patil et al. 2010, Balakumar et al. 2017). Esta dose é a mais comumente utilizada e tem sido relatada por se demonstrar capaz de desenvolver a disfunção renal e nefrotoxicidade em ratos (Stojiljkovic et al. 2008, Stojiljkovic et al. 2009), o que vai de acordo com nossos achados, uma vez que, nos cortes histológicos, também podemos observar alterações renais compatíveis com necrose tubular aguda, o que sugere a perda de função renal.

Com relação à urinálise, a informação mais relevante foi a presença de proteína nos grupos com PA e/ou IRA (grupos PA, IRA e IRA+PA). A presença de proteínas na urina, denominada proteinúria, é condizente com a insuficiência renal aguda, comprovando o modelo experimental nos grupos IRA e IRA+PA. A presença de proteínas na urina em animais normais pode ocorrer pela presença de células de descamação, hemácias e leucócitos, mesmo em quantidade reduzida (Sênior et al. 2005), entretanto, no presente estudo, o grupo PA apresentou mais espécimes com proteínas na urina do que o grupo C, sugerindo que a presença da periodontite apical possa ter interferido neste

parâmetro. Este foi o primeiro estudo realizado pelo grupo de pesquisa em que foram realizadas análises urinárias, necessitando, desta forma, de novos estudos que possam esclarecer essa questão.

A análise do perfil hematológico é um método utilizado para verificar a associação de infecções bucais com alterações sistêmicas e seus efeitos na saúde e homeostase corporal (Gkrania-Klotsaset al. 2010). A análise sanguínea é frequentemente utilizada para avaliar a presença de infecção ou inflamação, permitindo determinar quando a periodontite apical afeta os parâmetros hematológicos (Cintra et al. 2014a). Estudos mostraram as diferenças nos parâmetros hematológicos de ratos normais comparados aos ratos diabéticos na presença ou não de periodontite apical e/ou doença periodontal (Cintra et al. 2014a) e em múltiplos focos da periodontite apical (Cintra et al. 2014, Taylor & Borgnakke 2008). Em ratos diabéticos foi observado um aumento de linfócitos no sangue, principalmente em resposta à infecção bacteriana na periodontite apical (Samuel et al. 2017). O aumento no número de células inflamatórias resultantes da periodontite apical pode aumentar os efeitos deletérios das doenças autoimunes. Podem também ativar mediadores inflamatórios e aumentar o estresse oxidativo, exacerbando a inflamação em diferentes partes do corpo (Bian et al. 2012). Uma vez que as vias biológicas que ativam a inflamação e a autoimunidade são as mesmas, a presença de periodontite apical pode aumentar os efeitos deletérios das doenças autoimunes, e a patogênese da doença autoimune também pode potencializar os efeitos da periodontite apical em uma relação bidirecional (Gomes et al. 2013, Gomes et al. 2015).

Os resultados do perfil hematológico mostraram algumas alterações sanguíneas nos animais tanto com as doenças isoladas quanto associadas, quando foram comparados aos valores do grupo controle. Quanto à série vermelha, foi observado que as hemácias (He), a hemoglobina (Hb), e o volume globular (VG) reduziram nos grupos IRA e IRA+PA em ambos os períodos experimentais. As hemácias, também conhecidas por eritrócitos, são as células sanguíneas; a hemoglobina, é a proteína contida no interior das hemácias responsável pelo transporte de oxigênio no sistema circulatório; e o volume globular, corresponde tanto ao tamanho dos glóbulos vermelhos quanto

ao volume que eles ocupam no sangue. Em estudo em humanos com insuficiência renal, foram observadas alterações na série vermelha em relação aos valores normais, o que pode ser atribuído a um déficit relativo de eritropoietina, uma vez que uma das funções do rim é a produção de glóbulos vermelhos (Alves & Gordan, 2007).

O volume corpuscular médio (VCM) apresentou-se significativamente reduzido nos grupos PA e IRA e, ainda mais, no grupo IRA+PA no período de 15 dias, mostrando que este fator é agravado com a associação das duas patologias. Já no segundo período experimental, o VCM retornou ao estágio de normalidade, onde todos os grupos se igualaram novamente. O VCM define o volume das hemácias e é utilizado para classificar as anemias em normocítica, microcítica e macrocítica. Essa redução observada nos grupos com IRA também pode ser atribuída ao déficit relativo de eritropoietina relatado anteriormente (Alves & Gordan, 2007). Com relação à redução encontrada nos grupos com PA (PA e IRA+PA), alguns estudos também relataram uma redução em parâmetros da série vermelha do hemograma na presença de doença periodontal mais agressiva, sugerindo que a doença periodontal pode estar associada com a patogênese da anemia leve (Anand et al. 2013, Agarwal et al. 2009). A explicação mais provável para isso é que a inflamação periodontal pode afetar a eritropoiese (Yamamoto et al. 2011). Uma vez que a doença periodontal e a periodontite apical possuem as mesmas vias biológicas, possivelmente, a periodontite apical também possa ter relação com a eritropoiese.

Verificou-se uma prevalência de leucócitos principalmente no grupo IRA+PA no período de 15 dias. Com relação ao período de 30 dias, o grupo IRA+PA se igualou ao grupo IRA. Um aumento significativo de neutrófilos também foi observado no grupo IRA+PA no período de 15 dias, tendo os mesmos se igualado no período de 30 dias. No período de 15 dias, o aumento de linfócitos foi observado em todos os grupos experimentais, em ambos os períodos. Estudos anteriores verificaram que as infecções orais quando presentes, isoladas ou em associação com a diabetes, afetam os parâmetros hematológicos, causando aumento de leucócitos, neutrófilos e linfócitos (Cintra et al. 2014, Samuel et al. 2017). Resultados de estudos também confirmaram

que a infecção endodôntica em múltiplos dentes pode levar à diminuição do nível de IL-4 no sangue, mas aumentam os níveis de linfócitos e de TNF- $\alpha$ . Características histológicas também confirmaram essa relação: além de aumento dos níveis de linfócitos no sangue, houve aumento dos níveis de linfócitos em resposta à infecção bacteriana na PA (Samuel et al. 2017).

O método de rotina utilizado para avaliar a função renal é a medida da concentração plasmática de substâncias excretadas pelos rins, como a ureia e creatinina (Santin et al. 2006). Essas substâncias são excretadas pelos rins através da filtração glomerular e sua concentração plasmática depende da filtração glomerular. Em nosso estudo, os grupos com insuficiência renal apresentaram níveis mais elevados de creatinina sérica quando comparados aos outros dois grupos. Esses achados estão de acordo com outros estudos nos quais níveis elevados de creatinina podem confirmar as lesões renais (Balakumar et al. 2017, Cashmi et al. 2017, Kashef et al. 2015, El-Gamal et al. 2014, Aygun et al. 2012).

A ureia é um produto do catabolismo de aminoácidos e proteínas, formado principalmente no fígado, sendo filtrado e excretado pelos rins, podendo também ser considerado um biomarcador. Quando a concentração plasmática de ureia é elevada, a disfunção renal está presente. Mudanças nos níveis desse marcador já foram relacionadas ao uso de gentamicina (Adeneye et al. 2008, Shirwaikar et al. 2004). Em nosso estudo, os grupos IRA e IRA+PA apresentaram maiores níveis de ureia quando comparados aos grupos controle e PA. Esses resultados se assemelham a outros estudos para a demonstração de insuficiência renal (Balakumar et al. 2017, Kashef et al. 2015, El-Gamal et al. 2014, Aygun et al. 2012, Pessoa et al. 2011).

Os níveis séricos de proteína no sangue são indicativos de lesão glomerular ou tubular (Banday et al. 2008). Esses níveis, quando reduzidos, são causados pelo agravamento da lesão renal causada pela gentamicina (Papanikolaou et al. 1992, Banday et al. 2008). Em nosso estudo, o grupo PA foi capaz de reduzir os níveis séricos de proteína, assemelhando-se ao grupo IRA. No entanto, a periodontite apical não foi capaz de potencializar essa redução no grupo PA+IRA. A redução nos níveis séricos de proteína também foi relatada em outros estudos que utilizaram modelos animais com

insuficiência renal aguda (Teslariu et al. 2016, El-Gamal et al. 2014, Pessoa et al. 2011). Entretanto, não foram encontrados estudos na literatura que correlacionem a periodontite apical e a redução de proteínas séricas no sangue. Este achado vai de encontro à proteinúria na urina relatado anteriormente, uma vez que se elas são eliminadas mais facilmente pelo trato urinário, elas estarão em menores concentrações no soro. Assim como a análise urinária, são necessários novos estudos para que seja possível justificar a relação bidirecional existente entre a periodontite apical e as proteínas.

Macroscopicamente, houve notável alteração cromática do órgão, onde o vermelho-amarronzado, coloração típica de um rim saudável, foi substituído por uma coloração mais esbranquiçada e sugestiva de necrose. Além de alteração cromática mais acentuada, os rins doentes se apresentaram menores quando comparados aos rins de animais saudáveis.

Com relação à análise histológica na mandíbula, o exame microscópico não revelou inflamação e reabsorção óssea nos grupos C e IRA, uma vez que nestes grupos não foi induzida a periodontite apical. No entanto, histologicamente, os infiltrados inflamatórios periapicais no grupo PA foram mais intensos, apresentando mais células inflamatórias quando comparado ao grupo IRA+PA nos mesmos períodos. Além disso, a área de reabsorção óssea decorrente da presença da lesão periapical foi significativamente maior no grupo PA quando comparada ao grupo IRA+PA no período experimental de 15 dias. Já no período de 30 dias, não houve diferenças estatísticas entre os grupos, embora o grupo PA tenha apresentado maior reabsorção óssea junto ao periápice dentário. Esses resultados não corroboram com estudos prévios sobre outras desordens sistêmicas e a periodontite apical (Kodama et al. 2011, Cintra et al. 2014a), onde ratos diabéticos apresentavam maior inflamação e maior lesão periapical quando comparados à ratos normais. Este fato pode estar associado ao fato da gentamicina ter amplo espectro de ação e às suas propriedades bactericidas (Gogia et al. 2009), tendo, desta forma, inibido a atividade das bactérias logo no início do desenvolvimento da periodontite apical, modificando a microbiota oral dos animais. Além disso, alguns antibióticos, como por exemplo, a Azitromicina, também são capazes de

promoverem a imunomodulação (Parnham et al. 2014, Cramer et al. 2017). Não existem relatos sobre a capacidade imunomoduladora da Gentamicina, entretanto, caso este antibiótico possua tal propriedade, ele seria capaz de modular o hospedeiro fazendo com que o desenvolvimento da lesão periapical tenha se dado de forma reduzida, atenuando, desta forma, os efeitos causados pela insuficiência renal aguda. Outro fator importante é que a gentamicina poder ser utilizada na antibioticoterapia de regeneração óssea (Buchholz et al., 1979). Em 1979, Buchholz e colaboradores apresentaram resultados de operações de artroplastias infectadas do quadril, com substituição da prótese, utilizando cimento ósseo com e sem gentamicina, revelando cura em 71% dos casos, com uma única operação. No mesmo ano, criaram-se esferas impregnadas com gentamicina e usou-as apenas para ocupar o espaço morto do osso infectado, após o desbridamento. Este tratamento teve sucesso em 91,4% dos casos (Klemm, 1979). Além disso, outros estudos comprovaram a eficácia da gentamicina na regeneração óssea quando combinada à algum biomaterial (Fleiter et al. 2014, Teller et al. 2007, Rauschmann et al. 2005, Meseguer-Olmo et al. 2002). Estes achados na literatura podem justificar o efeito da gentamicina sobre o perfil inflamatório e reabsorção óssea na região periapical de ratos com periodontite apical.

Durante a formação e desenvolvimento da periodontite apical, as células inflamatórias (células T, células B e macrófagos) são recrutadas para os tecidos periapicais para eliminar a infecção. Isso resulta em uma clássica "cascata de citocinas" (Liapatas et al. 2003, Silva et al. 2012) em que TNF- $\alpha$  promove a sensibilidade dos osteoclastos maduros ao ativador do receptor do fator nuclear kappa-B (Weitzmann et al. 2005). Junto com o seu receptor, o receptor ativador do fator nuclear kappa-B aumenta a formação, ativação e sobrevivência de osteoclastos em uma variedade de condições patológicas de reabsorção óssea, incluindo a periodontite apical (Silva et al. 2012). Assim como o TNF- $\alpha$ , a interleucina IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que regula positivamente a síntese de colagenases e prostaglandinas (Azuma et al., 2017). Desta forma, tanto TNF- $\alpha$  quanto a IL-6 atuam como mediadores pró-inflamatórios durante reabsorção óssea na periodontite apical (Martinho et al., 2012). No presente estudo, TNF- $\alpha$  demonstrou padrão de imunomarcção

maior no grupo PA nos períodos de 15 e 30 dias quando comparado aos demais grupos. Com relação à IL-6, o padrão de imunomarcção foi o mesmo nos grupos PA e IRA+PA em ambos os períodos experimentais.

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que medeia múltiplas respostas inflamatórias crônicas, incluindo a angiogênese, o recrutamento de células inflamatórias e a indução de mediadores pró-inflamatórios por tecidos endoteliais e epiteliais (Ouyang et al. 2008, Queiroz-Junior et al. 2010). Embora o papel da IL-17 na lesão periapical e doenças periodontais tenha se tornado um assunto de investigação, alguns relatos sugerem que ela esteja relacionada à progressão de infecções crônicas localizadas, como a doença periodontal (Schenkein et al. 2010) e a periodontite apical (Marçal et al. 2010) e em patologias sistêmicas graves, como a diabetes (Kramer & Gaffen, 2007). Postula-se que essa citocina atua estimulando a produção de neutrófilos e, portanto, promove a exacerbação de lesões crônicas e inflamatórias sob condições sistêmicas (Marçal et al. 2010, Silva et al. 2012, Bian et al. 2012). No presente estudo, a IL-17 apresentou padrão de imunomarcção igual nos grupos PA e IRA+PA em ambos os períodos experimentais.

A citocina inflamatória, IL-23, pertence à família IL-12 (Oppmann et al. 2000), afeta células T de memória e macrófagos inflamatórios, funcionando via ligação ao seu receptor específico, IL-23R, que é expresso por essas células (Murphy et al. 2003, Teng et al. 2015). Estudos anteriores sugerem que a IL-23 desempenha um papel crucial na patogênese da periodontite. Níveis aumentados de IL-23 foram observados no tecido gengival e estavam associados a perda óssea na periodontite (Lester et al. 2007, Ohya et al. 2009, Cifcibasi et al. 2015). No presente estudo, a IL-23 apresentou padrão de imunomarcção superior no grupo PA quando comparado ao grupo IRA+PA no primeiro período experimental. Hipotetizamos que os resultados obtidos na análise imunohistoquímica possam ter relação com a atividade local da gentamicina que já foi discutida anteriormente. Neste caso, é necessário que novos estudos sejam realizados para que se possa confirmar a ação local da gentamicina na periodontite apical sobre as citocinas inflamatórias.

Apesar deste amplo estudo a respeito da relação bidirecional entre a PA e a IRA, outros estudos se fazem necessário para investigar mais profundamente esta relação e confirmar os achados do presente estudo.

## **7- CONCLUSÃO**

### **7.1. Conclusão do objetivo geral**

A IRA influenciou na severidade da PA reduzindo o perfil do infiltrado inflamatório aos 15 e 30 dias e na perda óssea aos 15 dias.

### **7.2. Conclusões dos objetivos específicos**

- A presença da PA não influenciou nas análises urinárias de ratos com IRA, entretanto, ratos com PA apresentaram proteínas na urina em ambos os períodos experimentais;

- A presença da PA influenciou nos parâmetros do hemograma de ratos portadores de IRA; além disso, a PA foi capaz de reduzir os níveis de proteína no soro em ambos os períodos experimentais.

- As lesões no tecido renal foram comprovadas em todos os animais com IRA através da presença de dilatação tubular, necrose de células epiteliais e células com núcleos picnóticos;

- A IRA influenciou no desenvolvimento da PA reduzindo o perfil do infiltrado inflamatório aos 15 e 30 dias e a perda óssea aos 15 dias. Além disso, a IRA influenciou reduzindo a imunomarcagem para TNF- $\alpha$  em ambos os períodos experimentais e para a IL-23 no primeiro período experimental.

## 8- REFERÊNCIAS

1. Adeneye AA, Benebo AS. Protective effect of the aqueous leaf and seed extract of *Phyllanthus amarus* on gentamicin and acetaminophen-induced nephrotoxic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008;118:318-23.
2. Agarwal N, Kumar VS, Gujjari SA. Effect of periodontal therapy on hemoglobin and erythrocyte levels in chronic generalized periodontitis patients: an interventional study. *J Indian Soc Periodontol*. 2009;13:6–11.
3. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem*. 2003;278(3):1910-4.
4. Alves MAR, Gordan PA. Diagnóstico de anemia em pacientes portadores de doença renal crônica. *J Bras Nefrol*. 2007; v.29, n.4, Supl.4.
5. Anand PS, Sagar DK, Ashok S, Kamath KP. Association of aggressive periodontitis with reduced erythrocyte counts and reduced hemoglobin levels. *J Periodontal Res*. 2013;49:719–28.
6. Appel GB, Neu HC. The nephrotoxicity of antimicrobial Agents. *New Engl J Med*. 1977;269-663.
7. Astolpho RD, Curbete MM, Chiba FY, Cintra LT, Ervolino E, da Mota MS, Antoniali C, Garbin CA, Sumida DH. Periapical Lesions Decrease Insulin Signaling in Rat Skeletal Muscle. *J Endod*. 2015;41(8):1305-10.
8. Aygun FO, Akçam FZ, Kaya O, Ceyhan BM, Sutçu R. Caffeic acid phenethyl ester modulates gentamicin-induced oxidative nephrotoxicity in kidney of rats. *Biological Trace Element Research*. 2012;145:211-16.
9. Astolpho RD, Curbete MM, Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, Prieto AK, Cintra LT, Bomfim SR, Ervolino E, Sumida DH. Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. *J Endod*. 2013; 39(5):648-52.
10. Azeez OI, Oyagbemi AA, Oyeyemi MO, Odetola AA. Ameliorative effects of *Cnidioscolus aconitifolius* on alloxan toxicity in Wistar rats. *Afr Health Sci*. 2010;10(3):283-91.
11. Azuma MM, Gomes-Filho JE, Cardoso CBM, Pipa CB, Narciso LG, Bomfim SRM, et al. Omega 3 Fatty Acids Reduce the Triglyceride Levels in Rats with Apical Periodontitis. *Braz Dental J*. 2018;29:173-8
12. Azuma MM, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Pipa CB, Cardoso CBM, Andrada, AC, Kawai T, Cintra LTA. Omega 3 fatty acids reduce bone resorption while

- promoting bone generation in rat periapical periodontitis. *J Endod.* 2017;43(6):970-6.
13. Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezan-Junior E, Cintra LT. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. *Int Endod J.* 2013;47(7):615-21.
  14. Balakumar P, WitnessKoe WE, Gan YS, JemayPuah SM, Kuganesswari S, Prajapati SK, Varatharajan R, Jayachristy SA, Sundram K, Bahari MB. Effects of pre and post-treatments with dipyridamole in gentamicin-induced acute nephrotoxicity in the rat. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2017;84:35-44.
  15. Banday AA, Farooq N, Priyamvada S, Yusufu ANK, Khan F. Time dependent effects of gentamicin on the enzymes of carbohydrate metabolism, brush border membrane and oxidative stress in rat kidney tissues. *Life Sciences.* 2008;82:450-9.
  16. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute Renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical Care.* 2004;8:204-12.
  17. Berne, Levi. *Fisiologia.* 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
  18. Bian Z, Guo Y, Ha B, Zen K, Liu Y. Regulation of the inflammatory response: enhancing neutrophil infiltration under chronic inflammatory conditions. *J Immunol.* 2012;188:844–53.
  19. Cardoso CBM, Conti LC, Siviéri-Araújo, Cintra LTA. Standardization of the experimental model of Acute Renal Failure for bidirectional study with an Apical Periodontitis. *DentalPress Endodontics.* 2018. In press.
  20. Christo JS, Rodrigues AM, Mouro MG, Cenedeze MA, Simões MS, Schor N, Higa EMS. Nitric oxide (NO) is associated with gentamicin (GENTA) nephrotoxicity and the renal function recovery after suspension of GENTA treatment in rats. *Nitric Oxide.* 2011;24:77–83.
  21. Chohfi M, Langlais F. O cimento ortopédico associado à vancomicina: comportamento mecânico e difusão do antibiótico. *Rev. Bras. Ortop.* 1994;29(6).
  22. Cifcibasi E, Koyuncuoglu C, Ciblak M, Badur S, Kasali K, Firatli E and Cintan S: Evaluation of Local and Systemic Levels of Interleukin-17, Interleukin-23,

- and myeloperoxidase in response to periodontal therapy in patients with generalized aggressive periodontitis. *Inflammation*. 2015;38: 1959-68.
23. Cintra LT, da Silva Facundo AC, Azuma MM, Sumida DH, Astolphi RD, Bomfim SR, Narciso LG, Gomes-Filho JE. Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats. *Clin Oral Investig*. 2013a; 17:1595-9.
  24. Cintra LT, Facundo ACS, Valentim D, Prieto AKC, Silva CO, Sumida DH, Bomfim SRM, Dezan-Junior E, Gomes-Filho JE. Effect of Oral Infections on Serum Creatinine Levels in Diabetic Rats. *Int J Diabet Vasc Dis Res*. 2013b;1(3):1-6.
  25. Cintra LT, da Silva Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Narciso LG, Mogami Bomfim SR, Oliveira e Silva C, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. *J Endod*. 2014a;40(8):1139-44.
  26. Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, de Lima VM, Sumida DH, Coclete GA, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Apical periodontitis and periodontal disease increase serum IL-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. *Clin Oral Investig*. 2014b;18(9):2123-8.
  27. Cintra LT, Samuel RO, Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Bomfim SR, Souza JC, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. *Int Endod J*. 2014c;47(3):228-37.
  28. Cintra LT, Samuel RO, Prieto AK, Sumida DH, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Oral health, diabetes, and body weight. *Arch Oral Biol*. 2016a;73:94-9.
  29. Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, de Queiróz AO, Ervolino E, Sumida DH, de Lima VM, Gomes-Filho JE. Multiple Apical Periodontitis Influences Serum Levels of Cytokines and Nitric Oxide. *J Endod*. 2016b;42(5):747-51.
  30. Colic M, Gazivoda D, Vasilijic S, Vucevic D, Lukic A. Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(9):690-6.
  31. Colić M, Gazivoda D, Vucević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesion. *Mol Immunol*. 2009;47:101-13.

32. Cramer CL, Patterson A, Alchakaki A, Soubani AO. Immunomodulatory indications of azithromycin in respiratory disease: a concise review for the clinician. *Postgrad Med.* 2017;129:493-9.
33. Cynthia AN. Drug Induced Nephrotoxicity. *Am Fam Physician.* 2008;78(6):743-50.
34. Derakhshanfar A, Bidadkosh A, Kazeminia S. Vitamin E protection against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats: a biochemical and histopathologic study. *Iranian Journal Of Veterinary Research.* 2007; 8:231-8.
35. Eaton D, Pooler JP. *Fisiologia renal de Vander.* 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
36. Fan R, Sun B, Zhang CF, Lü YL, Xuan W, Wang QQ, Yin XZ. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin expression in chronic apical periodontitis: possible association with inflammatory cells. *Chin Med J (Engl)* 2011;124:2162-6.
37. Farombi EO, Ekor M. Curcumin attenuates gentamicin-induced renal oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44(9):1443-8.
38. Fleiter N, Walter G, Bösebeck H, Vogt S, Büchner H, Hirschberger W, Hoffmann R. Clinical use and safety of a novel gentamicin-releasing resorbable bone graft substitute in the treatment of osteomyelitis/osteitis. *Bone Joint Res.* 2014; 3(7):223-9.
39. Gaffen SL. Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol.* 2011; 23:613-9.
40. Gkrania-Klotsas<sup>1</sup> E, Ye Z, Cooper AJ , Sharp SJ, Luben SJ , Biggs ML, et al. Differential White Blood Cell Count and Type 2 Diabetes: Systematic Review and Meta-Analysis of Cross-Sectional and Prospective Studies. *Pros one.* 2010;1-11.
41. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol* 2011; 17:3.
42. Greco DS, Turnwald GH, Adams R. Urinary gamma glutamil transpeptidase activity in dogs with gentamicin-induced nephrotoxicity. *American Journal of Veterinary Research.* 1985;46(11):2332-5.
43. Gogia, J.S., Meehan J.P., Cesare P.E., Jamali AA. Local Antibiotic Therapy in Osteomyelitis. *Semin. Plast Surg.* 2009;100-7.

44. Gomes MS, Hugo FM, Hilgert JB, Sant'Ana Filho M, Padilha DMP, Simonsick EM. Apical periodontitis and incident cardiovascular events in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Int J Endod*. 2015.
45. Gomes MS, Blattner TC, Sant'AnaFilho M, Grecca FS, Hugo FN, Fouad AF, Reynolds MA. Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? A systematic review and meta-analysis. *J Endod*. 2013;39:1205–17.
46. Harita N, Hayashi T, Sato KK, Nakamura Y, Yoneda T, Endo G, Kambe H. Lower serum creatinine is a new risk factor of type 2 diabetes: the Kansai healthcare study. *Diabetes Care*. 2009;32(3):424-6.
47. Hosohata K. Role of Oxidative Stress in Drug-Induced Kidney Injury. *Int J Mol Sci*. 2016;11:1-17.
48. Ioannidou E, Swede H. Disparities in periodontitis prevalence among chronic kidney disease patients. *J Dent Res*. 201;90(6):730-4.
49. Jamshidzadeh A, Heidari R, Mohammadi-Samani S, Azarpira N, Najbi A, Jahani P, Abdoli N. A Comparison between the nephrotoxic Profile of Gentamicin and Gentamicin Nanoparticles in Mice. *J Biochem Molecular Toxicology*. 2015;29(2):57-62.
50. Kellum JA. Acute kidney injury. *Critical Care Medicine*. 2008;36:141-5.
51. Klemm K. Gentamicin-PMMA-beads in treating bone and soft tissue infections. *Zentralbl Chir*. 1979;104(14):934-42.
52. Kodama Y, Matsuura M, Sano T, et al. Nakahara Y, Ozaki K, Narama I, Matsuura T. Diabetes enhances dental caries and apical periodontitis in caries-susceptible WBN/KobSlc rats. *Comp Med*. 2011;61:53-9.
53. Kramer JM, Gaffen SL. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *J Periodontol*. 2007;78:1083-93.
54. Lester SR, Bain JL, Johnson RB and Serio FG: Gingival concentrations of interleukin-23 and -17 at healthy sites and at sites of clinical attachment loss. *J Periodontol*. 2007;78:1545-50.
55. Liangos O, Wald R, O' Bell JW, Prince L, Pereira BJ, Jaber BL. Epidemiology and outcomes of acute renal failure in hospitalized patients: A national survey. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1:43-51.
56. Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J*. 2003;36:464–71.

57. López-López J, Jané-Salas E, Estrugo-Devesa A, Velasco-Ortega E, Martín-González J, Segura-Egea JJ. Periapical and endodontic status of type 2 diabetic patients in Catalonia, Spain: a cross-sectional study. *J Endod.* 2011;37(5):598-601.
58. Lukic A, Danilovic V, Petrovic R. Comparative immunohistochemical and quantitative analysis of inflammatory cells in symptomatic and asymptomatic chronic periapical lesions. *Vojnosanit Preg* 2008;65:435–40.
59. Marçal JR, Samuel RO, Fernandes D, de Araujo MS, Napimoga MH, Pereira SA, Clemente-Napimoga JT, Alves PM, Mattar R, Rodrigues V Jr, Rodrigues DB. Thelper cell type 17/regulatory Tcell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod.* 2010;36:995-9.
60. Marcotte L, Godwin M. Natural history of elevated creatinine levels. *Can Fam Physician.* 2006;52(10):1264-5.
61. Markowitz GS, Perazella MA. Drug-induced renal failure: a focus on tubulointerstitial disease. *Clinica Chimica Acta.* 2005;352:31-47.
62. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, et al. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *J Endod.* 2012;38:740–5.
63. Mehta RL, Pascua LMT, Sorokos S. Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: The PICARD experience. *The Kidney International.* 2004;66:1613-21.
64. Meseguer-Olmo L, Ros-Nicolás MJ, Clavel-Sainz M, Vicente-Ortega V, Alcaraz-Baños M, Lax-Pérez A, Arcos D, Ragel CV, Vallet-Regí MJ. Biocompatibility and in vivo gentamicin release from bioactive sol-gel glass implants. *Biomed Mater Res.* 2002;61(3):458-65.
65. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2003;198(12):1951-7.
66. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15: 348-81.
67. Nibali L, Fedele S, D'Aiuto F, Donos N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral Dis.* 2012;18:236-43.
68. Nunes TF, Brunetta DM, Leal CM, Pisi PCB, Roriz-Filho JS. Insuficiência renal aguda. *Medicina (Ribeirão Preto).* 2010;43:272-82.

69. Odagiri K, Uehara A, Mizuta I, Yamamoto M, Kurata C. Longitudinal study on white blood cell count and the incidence of metabolic syndrome. *Intern Med.* 2011;50(21):2491-8.
70. Ohyama H, Kato-Kogoe N, Kuhara A, Nishimura F, Nakasho K, Yamanegi K, Yamada N, Hata M, Yamane J and Terada N: The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res.* 2009;88:633-8.
71. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 2000;13(5):715-25.
72. Osborne AC. A Clinician's Analysis of Urinalysis. In: OSBORNE, A. C.; FINCO, R. D. *Canine and Feline Nephrology and Urology.* LEA & FEBIGER BOOK. 1995;136-205.
73. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 20018;28:454–67.
74. Pannu N, Nadim MK. An overview of drug-induced acute kidney injury. *Critical Care Medicine.* 2008;36:216-23.
75. Papanikolaou N, Peros G, Morphake P, Gkikas G, Maraghiann D; Tsipas G, Kostopoulos K, Arambatze C, Gkika EL, Bariety J. Does gentamicin induce acute renal failure by increasing renal TXA2 synthesis in rats? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1992;45(2):131-6.
76. Parnham MJ, Erakovic Haber V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Perletti G, Verleden GM, Vos R. Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacol Ther.* 2014;143:225-45.
77. Pessoa EA, Convento MB, Ribas OS, Tristão VR, Reis LA, Borges FT, Schor N. Preconditioning induced by gentamicin protects against acute kidney injury: The role of prostaglandins but not nitric oxide. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2011;1–6.
78. Queiroz-Junior CM, Silva MJ, Corrêa JD, Madeira MF, Garlet TP, Garlet GP, Cunha FQ, Teixeira MM, da Silva TA. A controversial role for IL-12 in immune response and bone resorption at apical periodontal sites. *Clin Dev Immunol* 2010:327–417.
79. Rauschmann MA, Wichelhaus TA, Stiral V, Dingeldein E, Zichner L, Schnettler R, Alt V. Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections. *Biomaterials.* 2005; 26:2677-84.

80. Rodríguez-Barbero A, AM Rodríguez-López, González- Sarmiento R, López-  
Novoa JM. Gentamicin activates cultured rats mesangial cells. A role for  
platelet activating factor. *Kidney Int.* 1995;47:1346.
81. Samuel RO, Gomes-Filho JE, Azuma MM, Sumida DH, de Oliveira SHP,  
Chiba FY, Bomfim SRM, Ciarlini PC, Narciso LG, Cintra LTA. Endodontic  
infections increase leukocyte and lymphocyte levels in the blood. *Clin Oral  
Investig.* 2017;22:1395–401.
82. Santin F, Moutinho FQ, do Amaral AS, Takahira RK. Acompanhamento  
laboratorial da função renal de cães sadios tratados experimentalmente com  
doses terapêuticas de anfotericina B. *Ciência Rural.* 2006; 36(6):1816-23.
83. Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE, Tew JG. IL-17  
in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res.* 2010; 89:943-  
7.
84. Schor N, Ichikawa, HG Rennke, JL, Troy and BM Brenner. Pathophysiology  
of altered glomerular function in aminoglycoside treated rats. *Kidney Int.*  
1981;19:288.
85. Senior DF. Proteinúria. In: 30th World Small Animal Veterinary Association,  
México, 2005.
86. Silva JA, Ferrucci DL, Peroni LA, Abrahão PG, Salamene AF, Rossa-Junior C,  
Carvalho HF, Stach-Machado DR. Sequential IL-23 and IL-17 and increased  
Mmp8 and Mmp14 expression characterize the progression of an  
experimental model of periodontal disease in type 1 diabetes. *J Cell Physiol.*  
2012;227:2441-50.
87. Silva MJ, Kajiya M, AlShwaimi E, et al. Bacteria-reactive immune response  
may induce RANKL-expressing T cells in the mouse periapical bone loss  
lesion. *J Endod.* 2012;38:346–50.
88. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral  
inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent  
Res.* 2007;86:306-19.
89. Shirwaikar A, Isaac D, Malini S. Effect of *Aerva lanata* on cisplatin and  
gentamicin models of acute renal failure. *Journal of Ethnopharmacology.*  
2004;90:81-6.
90. Sociedade Brasileira de Nefrologia. (2019). Acesso em 19 de 05 de 1029,  
disponível em [sbn.org.br/publico](https://sbn.org.br/publico): <https://sbn.org.br/publico/doencas-comuns/insuficiencia-renal-aguda/>.

91. Sodimbaku V, Pujari L, Mullangi R, Marri S. Carrot (*Daucus carota* L.): Nephroprotective against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Indian J Pharmacol.* 2016;48(2):122–7.
92. Spanaus KS, Kollerits B, Ritz E, Hersberger M, Kronenberg F, Von Eckardstein A. Serum creatinine, cystatin C, and beta-trace protein in diagnostic staging and predicting progression of primary nondiabetic chronic kidney disease. *Clin Chem.* 2010;56(5):740-9.
93. Stojiljkovic N, Veljkovic S, Mihailovic D, Stoiljkovic M, Radovanovic D, Randelovic P. The effect of calcium channel blocker verapamil on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 2008;8:170-6.
94. Stojiljkovic N, Veljkovic S, Mihailovic D, Stoiljkovic M, Radenkovic M, Rankovic G, et al. Protective effects of pentoxifylline treatment on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Ren Fail.* 2009;31:54-61.
95. Tansey MG, Szymkowski DE. The TNF superfamily in 2009: new pathways, new indications, and new drugs. *Drug Discovery Today* 2009; 14:1082-8.
96. Tavafi M, Ahmadvand H. Effect of rosmarinic acid on inhibition of gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Tissue & Cell.* 2011;43:392-97.
97. Taylor GW and Borgnakke WS. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis.* 2008;3:191-203.
98. Teixeira-Salum TB, Rodrigues DB, Gervásio AM, Souza CJ, Rodrigues V Jr, Loyola AM. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 2010; 39:250-6.
99. Teller M, Gopp U, Neumann HG, Kuhn KD. Release of gentamicin from bone regenerative materials: an in vitro study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;81:23-9.
100. Teng MW, Bowman EP, McElwee JJ, Smyth MJ, Casanova JL, Cooper AM and Cua DJ: IL-12 and IL-23 cytokines: From discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med.* 2015;21:719-29.
101. Udupa V and Prakash V. Gentamicin induced acute renal damage and its evaluation using urinary biomarkers in rats. *Toxicol Rep.* 2019;6:91–9.
102. Valipour P, Heidarian E, Khoshdel A, Gholami-Arjenaki M. Protective Effects of Hydroalcoholic Extract of *ferulago angulata* against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Iranian Journal of Kidney Diseases.* 2016; 10:189-96.
103. Xiong H, Wei L, Peng B. Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions. *J Endod.* 2009;35:216-20.

104. Yamamoto T, Tsuneishi M, Furuta M, et al. Relationship between decrease of erythrocyte count and progression of periodontal disease in a rural Japanese population. *J Periodontol.* 2011; 82:106–13.
105. Yarijani ZM, Najafi H, Madani SH. Protective effect of crocin on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2016; 19:337-43.
106. Weitzmann MN, Pacifici R. The role of T lymphocytes in bone metabolism. *ImmunolRev.* 2005;208:154–68.
107. Zager RA. Pathogenetic mechanisms in nephrotoxic acute renal failure. *Semin Nephrol.* 1997;17(1):3-14.
108. Zager RA. Subclinical gentamicin nephrotoxicity: a potential risk factor for exaggerated endotoxin-driven TNF- $\alpha$  production. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 293:43-9.
109. Zhang X, Peng B. Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. *J Endod* 2005;31:574-7.

## **9- SUPORTE FINANCEIRO**

Apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Processo nº 2016/23365-2.

## 10- ANEXO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Influência da insuficiência renal aguda no desenvolvimento e progressão da periodontite apical"**, Processo FOA nº 00373-2017, sob responsabilidade de Luciano Tavares Angelo Cintra apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 17 de Maio de 2017.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 05 de Agosto de 2019.

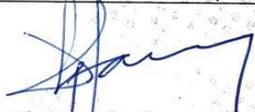
**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 05 de Setembro de 2019.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Influence of acute kidney injury on the development and progression of apical periodontitis"**, Protocol FOA nº 00373-2017, under the supervision of Luciano Tavares Angelo Cintra presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 17, 2017.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** August 05, 2019.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** September 05, 2019.

  
**Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP  
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br