



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

ANA CLAUDIA RODRIGUES DA SILVA

**Efeito da fumaça do cigarro na periodontite apical induzida
em ratos: Análise do perfil inflamatório e imuno-histoquímica
macrofágica**

Araçatuba

2022

ANA CLAUDIA RODRIGUES DA SILVA

**Efeito da fumaça do cigarro na periodontite apical induzida
em ratos: Análise do perfil inflamatório e imuno-histoquímica
macrofágica**

Dissertação apresentado ao programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Odontológica, Área de concentração em Endodontia.

Orientador: Prof. Assoc. Eloi Dezan Junior

Coorientadora: Profa. Mariza Akemi Matsumoto

Coorientador: Prof. Carlos Roberto Emerenciano
Bueno

Araçatuba

2022

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S586e	<p>Silva, Ana Claudia Rodrigues da. Efeito da fumaça do cigarro na periodontite apical induzida em ratos : análise do perfil inflamatório e imuno-histoquímica macrofágica / Ana Claudia Rodrigues da Silva. - Araçatuba, 2022 42 f. : il. ; tab.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientador: Prof. Eloi Dezan Junior Coorientadora: Profa. Mariza Akemi Matsumoto Coorientador: Prof. Carlos Roberto Emerenciano Bueno</p> <p>1. Fumantes 2. Inflamação 3. Macrófagos 4. Periodontite periapical I. Título</p>
	<p>Black D24 CDD 617.67</p>

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

DADOS CURRICULARES

Ana Claudia Rodrigues da Silva

Nascimento	27.01.1997
Filiação	Socorra de Jesus Rodrigues da Silva Claudio Archanjo da Silva
2015-2020	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP
2017-2018	Desenvolvimento do projeto de Iniciação Científica com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (nº 2017/00649-8).
2018-2019	Desenvolvimento do projeto de Iniciação Científica com auxílio da PIBIC/CNPq
2019-2019	Desenvolvimento do projeto de Iniciação Científica com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (nº 2018/19406-0).
2020-2022	Desenvolvimento do projeto de Mestrado em Ciências Odontológicas Área de Endodontia Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq (nº 131423/2020-7).

Dedico este trabalho

A minha família, meus pais Claudio Archanjo da Silva e Socorra de Jesus Rodrigues da Silva, e minha irmã Clarelice Rodrigues da Silva por serem meus maiores exemplos de força, respeito e dedicação.

Obrigada por estarem presentes em todos os momentos e por não medirem esforços para que meus sonhos se realizem. Essa conquista é nossa! Minha eterna gratidão e amor por vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Que sempre está ao meu lado para me guiar e amparar. Se cheguei até aqui, foi graças as bênçãos concedidas por Ele.

Aos meus familiares

Marinês Silva, Jaildo Silva, Antonio Rodrigues, Maria Helena Archanjo e avós Helena Archanjo e Natividade de Jesus, que além de torcerem por mim, ficaram ao meu lado em cada obstáculo e dificuldade ao longo desses anos de graduação e mestrado. Abraçou e apoiou minha família enquanto eu não estava por perto, deu suporte, amor, carinho e atenção. Eu tenho muito orgulho e me sinto abençoada por estar rodeada de seres humanos maravilhosos. Amo vocês.

Ao meu namorado

Jadison Junio Conforte, por me tranquilizar e ensinar a superar as dificuldades, pela paciência e dedicação ao nosso relacionamento. Tenho muito orgulho e respeito pela nossa evolução nesses 6 anos juntos, tenho certeza que é só o começo. Eu te amo!

Aos mestres

Meu orientador Eloi Dezan Junior, que me apresentou a Endodontia e me abriu as portas para o mestrado. Um exemplo de clínico e professor. Agradeço a confiança que o senhor depositou em mim e ao estímulo que me fez crescer profissionalmente. Na Pós-Graduação vivemos uma mistura de sentimentos e emoções, e o senhor sempre nos acolheu em sua casa para nos tranquilizar e mostrar que somos mais que equipe, somos parte da família.

Minha Coorientadora, Mariza Akemi Matsumoto que esteve comigo desde o primeiro ano da faculdade, me acompanhou, orientou e conduziu com maestria por 3 anos na iniciação científica, além de ser a inspiração na decisão de iniciar a pós-graduação. A senhora é um exemplo de bondade, de fé e amor ao próximo. Sempre nos ensinou com muita paciência e dedicação. Lembrarei da senhora com muito carinho e reconhecimento. Obrigada por tudo professora, é uma mãe para todos nós.

Ao Meu Coorientador Carlos Roberto Emerenciano Bueno, sempre muito prestativo e atencioso com todos. Obrigada pelos conselhos, pelo auxílio na execução do projeto de pesquisa e por confiar em mim. É um exemplo de profissional!

À Claudia Cristina Bigueti, minha querida orientadora de iniciação científica, obrigada por sempre me tratar com muito carinho e me proporcionar grandes aprendizados. Tenho muito orgulho e respeito pela sua trajetória e o que tem conquistado, é um grande exemplo para todos. Agradeço por estar comigo nessa caminhada novamente, e espero continuar aprendendo e trabalhando com você.

Aos professores Luciano Ângelo Tavares Cintra, Gustavo Sivieri de Araújo, Rogério de Castilho Jacinto, João Eduardo Gomes Filho e Juliano Milanezi de Almeida, os senhores são grandes inspirações na docência, na pesquisa e como clínicos. Agradeço pelos conselhos, pelas aulas, pelas considerações, participação direta ou indireta e por contribuírem para o meu crescimento na pós-graduação. Muito admiração por todos vocês!

Aos amigos

Da vida, Priscila Novais, Nathalia Gianoto, Vanessa Froes, Julia Nakazoni, José Neto, por fazerem parte da minha vida, mesmo estando longe, vocês são especiais e essenciais nessa caminhada, os melhores, amo vocês.

Aos meus amigos de pós graduação, Marcelo Seron, Bharbara Moura, Lucas Chalub, Larissa Nunes, Julia Andrade, Gabriela Pacheco, Cristiane Cantiga, Caroline Loureiro, Carol Barros, Nathalia Machado, Pedro Chaves, Ana Paula Fernandes que contribuíram direta ou indiretamente para o meu crescimento pessoal e profissional, que me fizeram sentir acolhida e amada, obrigada por tudo.

À minha parceira de apartamento e amiga Elisa Mara de Abreu Furquim, que compartilhou todas as etapas do mestrado comigo, as risadas, os choros, as angústias e as conquistas. Obrigada amiga, por ser ter amorosa e atenciosa. Amo você.

À Ana Maria Veiga Vasques, por compartilhar essa caminhada comigo e estar presente em todas as etapas do mestrado, nas frustrações e nas alegrias, nos altos e baixos, ser paciente e amiga.

À equipe dos Eloianos, Gustavo, Vitória, Marina, obrigada por todo conhecimento passado, e pelo carinho.

À toda a equipe Matsumoto, em especial, a Carol Bacelar e Gustavo Simionato Baroni, obrigada pelo auxílio na execução desse projeto e por serem atenciosos e prestativos. Obrigada!

Aos funcionários

Agradeço a toda equipe do Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora, em especial ao Carlos e Jorge por serem sempre muito solícitos e pacientes. Às

funcionárias da Seção de pós-graduação, Cristiane e Valéria, pela paciência e ajuda com os prazos e documentações, obrigada por tudo.

À Faculdade de Odontologia de Aracatuba,

Na pessoa dos professores: Prof. Titular Glauco Issamu Miyahara, digníssimo Diretor e Prof. Titular Alberto Botazzo Delbem, digníssimo Vice-Diretor.

Ao apoio das agências de fomento,

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Número do auxílio: 2020/06310-5) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Número da bolsa: 131423/2020-7).

E a todos aqueles que, de alguma forma contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho,

Minha eterna gratidão.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso”

John Ruskin.

DA SILVA, A.C.R. **Efeito da fumaça do cigarro na periodontite apical induzida em ratos: Análise do perfil inflamatório e imuno-histoquímica macrofágica.** 2022. 42f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a severidade da periodontite apical (PA) em ratos expostos à fumaça do cigarro, por meio da análise histológica do perfil inflamatório e imunomarcção macrofágica. **Material e Métodos:** Foram utilizados trinta e dois ratos machos Wistar distribuídos em quatro grupos (n=8): PA (ratos com PA induzida); F (ratos expostos à fumaça do cigarro); FPA (ratos com PA induzida expostos à fumaça do cigarro); C (ratos sem PA e sem exposição ao cigarro). Para inalação da fumaça do cigarro, os animais permaneceram em câmara de tabagismo por oito minutos, três vezes ao dia por vinte dias antes da indução da PA. Em seguida, os animais tiveram as polpas coronárias expostas ao meio oral por 30 dias para a indução da PA e continuaram inalando fumaça até completarem 50 dias. No momento da eutanásia, as hemi-maxilas do lado direito foram removidas para avaliar o perfil inflamatório por coloração em hematoxilina e eosina e imuno-histoquímica para marcação macrofágica F4/80 (macrófago), CD206 (M2) e iNOS (M1). Dados não paramétricos foram analisados por Kruskal-Wallis, seguido de post-hoc Dunn e Mann-Whitney ($P < .05$). **Resultados:** O infiltrado inflamatório foi moderado no grupo PA e intenso no grupo FPA ($P < .05$). A análise histomorfométrica de macrófagos M2 revelaram diferenças estatísticas entre os grupos C e PA, e F e FPA ($P > .05$). Na imunomarcção de macrófagos M1, os grupos C e F apresentaram diferenças significantes quando comparado aos grupos PA e FPA ($P < 0,05$). Enquanto os grupos PA e FPA apresentaram grande quantidade de células imunorreativas, sendo maior para o grupo FPA ($P < 0,05$). No anticorpo F4/80 não houve diferença entre os grupos ($P > .05$). **Conclusão:** A inalação da fumaça do cigarro em ratos contribuiu para uma reação inflamatória periapical mais intensa, com presença predominante de macrófagos pró-inflamatórios M1, agravando a severidade da periodontite apical.

Palavras-chave: Fumantes. Inflamação. Macrófagos. Periodontite periapical.

DA SILVA, A.C.R. **Effect of cigarette smoke inhalation on induced apical periodontitis in rats: inflammatory profile and macrophage immunohistochemistry analysis.** 2022. 42f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the severity of apical periodontitis (AP) in rats exposed to cigarette smoke, through histological analysis of the inflammatory profile and macrophage immunostaining. **Material and Methods:** thirty-two male Wistar rats were used, distributed into four groups (n=8): PA (rats with induced AP); F (rats exposed to cigarette smoke); FPA (AP-induced rats exposed to cigarette smoke); C (rats without AP and without exposure to cigarettes). For cigarette smoke inhalation, animals remained in a smoking chamber for eight minutes, three times daily for twenty days before AP induction. Then, animals had the coronary pulp exposed to oral environment for 30 days to induce AP while continued inhaling smoke until completing 50 days of experimental period. During euthanasia process, the right hemimaxillas were removed to assess inflammatory profile by hematoxylin and eosin staining and immunohistochemistry for macrophage immunolabeling: F4/80 (macrophage), CD206 (M2) and iNOS (M1). Nonparametric data were analyzed by Kruskal-Wallis, followed by post-hoc Dunn and Mann-Whitney ($P < .05$). **Results:** The inflammatory infiltrate was moderate in the PA group and intense in the FPA group ($P < .05$). Histomorphometric analysis of M2 macrophages revealed statistical differences between groups C and PA, and F and FPA ($P > .05$). In the immunostaining of M1 macrophages, groups C and F showed significant differences when compared to groups PA and FPA ($P < 0.05$). While the PA and FPA groups presented a large amount of immunoreactive cells, being higher for the FPA group ($P < 0.05$). In the F4/80 antibody there was no difference between the groups ($P > .05$) **Conclusion:** Inhalation of cigarette smoke in rats contributed to a more intense periapical inflammatory reaction, with a predominant presence of pro-inflammatory M1 macrophages, aggravating the severity of apical periodontitis.

Keywords: Smoking. Inflammation. Macrophages. Periapical periodontitis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Fluxograma do PRIASE 2021. 39
- Figura 2 -** Aspectos histológicos da região periapical (HE). Grupo C (a, a1); Grupo F (b, b1); Grupo PA (c, c1) e grupo FPA (d, d1). (a – d: aumento de 100x; a1 - d1: 400x) 40
- Figura 3 -** Imagens representativas da imuno-histoquímica dos marcadores macrofágicos: CD206 (M2), INOS (M1) e F4/80 (Macrófagos). Grupo C (controle); Grupo F (expostos a fumaça do cigarro); Grupo PA (periodontite apical) e grupo FPA (periodontite apical e exposição a fumaça do cigarro). (aumento de 100x) 41

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Valores dos escores do infiltrado inflamatório 36
- Tabela 2** - Os resultados são apresentados como média (\pm SD) e desvio padrão para cada parâmetro imuno-histoquímico. 37

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Análise imuno-histoquímica dos marcadores macrófagos CD206 (M2), INOS (M1) e F4 / 80 (Macrófagos).

38

SUMÁRIO

RESUMO.....	18
INTRODUÇÃO	19
MATERIAL E MÉTODOS	20
Cálculo do tamanho da amostra	21
Animais	21
Inalação da fumaça do cigarro	21
Indução da periodontite apical e coleta das amostras.....	22
Análise histológica e processamento das amostras	22
Análise Imuno-histoquímica	23
Análise estatística.....	23
RESULTADOS.....	23
Observações clínicas	23
Análise histopatológica	24
Análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório	24
Análise histomorfométrica da imuno-histoquímica	24
DISCUSSÃO	25
CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS.....	28
LEGENDA DE FIGURAS	35
Tabela 1 Valores dos escores do infiltrado inflamatório	36
Tabela 2 Os resultados são apresentados como média (\pm SD) e desvio padrão para cada parâmetro imuno-histoquímico.....	37
Gráfico 1 Análise imuno-histoquímica dos marcadores macrófagos CD206 (M2), INOS (M1) e F4 / 80 (Macrófagos).	38
Figura 1	39
Figura 2	40
Figura 3.....	41

Efeito da fumaça do cigarro na periodontite apical induzida em ratos: Análise do perfil inflamatório e imuno-histoquímica macrofágica

A.C.R. da Silva¹, A.M.V. Vasques¹, C.R.E. Bueno^{1,2}, M.T.S. Cury¹, E. Ervolino³, L.T.A. Cintra¹, C.C. Bigueti⁴, M.A. Matsumoto³, E. Dezan-Junior¹

¹Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba, São Paulo, Brasil

²Departamento de Endodontia, Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Jacarezinho, Paraná, Brasil

³Departamento de Ciências Básicas. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, São Paulo, Brasil

⁴Departamento de Bioengenharia. Universidade do Texas em Dallas (UTD), Dallas, Texas, Estados Unidos

Running title: Efeitos da fumaça do cigarro na AP

Autor Correspondente: Eloi Dezan Junior

Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba, São Paulo, Brasil

Rua José Bonifácio, 1193, 16015-050 Araçatuba, SP – BRASIL

Número de telefone:+55.18.3636.3254 Fax: +55.18.3636.3236

E-mail: eloi.dezan@unesp.br

Este artigo está de acordo com as normas do International Endodontic Journal

RESUMO

Objetivo: Avaliar a severidade da periodontite apical (PA) em ratos expostos à fumaça do cigarro, por meio da análise histológica do perfil inflamatório e imunomarcção macrofágica.

Metodologia: Trinta e dois ratos machos Wistar foram distribuídos em quatro grupos (n=8): PA (ratos com PA induzida); F (ratos expostos à fumaça do cigarro); FPA (ratos com PA induzida expostos à fumaça do cigarro); C (ratos sem PA e sem exposição ao cigarro). Para inalação da fumaça do cigarro, os animais permaneceram em câmara de tabagismo por oito minutos, três vezes ao dia por vinte dias antes da indução da PA. Em seguida, os animais tiveram as polpas coronárias expostas ao meio oral por 30 dias para a indução da PA e continuaram inalando fumaça até completarem 50 dias. No momento da eutanásia, as hemi-maxilas do lado direito foram removidas para avaliar o perfil inflamatório por coloração em hematoxilina e eosina e imuno-histoquímica para marcação macrofágica F4/80 (macrófagos), CD206 (M2) e iNOS (M1). Dados não paramétricos foram analisados por Kruskal-Wallis, seguido de post-hoc Dunn e Mann-Whitney ($P < .05$).

Resultados: O infiltrado inflamatório foi moderado no grupo PA e intenso no grupo FPA ($P < .05$). A análise histomorfométrica de macrófagos em geral não apresentaram diferenças entre os grupos ($P > .05$). Macrófagos M2 revelaram diferenças estatísticas entre os grupos C e PA, e F e FPA ($P > .05$). Na imunomarcção de macrófagos M1, os grupos C e F apresentaram diferenças significantes quando comparado aos grupos PA e FPA ($P < 0,05$). Enquanto os grupos PA e FPA revelaram grande quantidade de células imunorreativas, sendo maior para o grupo FPA ($P < 0,05$).

Conclusão: A inalação da fumaça do cigarro em ratos contribuiu para uma reação inflamatória periapical mais intensa, com presença predominante de macrófagos pró-inflamatórios M1, agravando a severidade da periodontite apical.

Palavras-chave: fumantes, inflamação, macrófagos, periodontite periapical.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da periodontite apical (PA) ocorre após infecção dos canais radiculares devido à exposição da polpa através da cárie ou trauma dental (Cintra *et al.* 2018, Chen *et al.* 2019). Inicialmente esse processo desencadeia uma resposta inflamatória imune (Thuller *et al.* 2021) que resulta na liberação de mediadores químicos causando a degeneração do tecido e reabsorção óssea (Cintra *et al.* 2018, Chen *et al.* 2019).

Quando se inicia um processo infeccioso, células da resposta imunológica inata com função fagocítica, como os macrófagos, atuam na defesa do organismo (Kawashima *et al.* 1996), constituindo cerca de 46% das células inflamatórias encontradas em granulomas periapicais (Stern *et al.* 1981). Os macrófagos são células heterogêneas, que possuem grande plasticidade (Tarique *et al.* 2015). De acordo com os estímulos do microambiente em que se encontram, podem polarizar e modificar seu fenótipo, o que influenciará no perfil inflamatório e na evolução da doença. A partir desse dinamismo, os macrófagos foram classificados em macrófagos M1 (ativação clássica) e macrófagos M2 (ativação alternativa) (Bazzan *et al.* 2017, Chen *et al.* 2019, Feng *et al.* 2020).

Macrófagos M1 possuem fenótipo pró-inflamatório, e atuam na defesa do hospedeiro na presença de bactérias, protozoários e vírus (Murray & Wynn 2011), produz espécies reativas de oxigênio e citocinas inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α (Weber *et al.* 2018, França *et al.* 2019), que estão relacionadas com a atividade e progressão da lesão, por exemplo, ativando vias de reabsorção óssea (Metzger 2000, Araujo-Pires *et al.* 2014). Em contrapartida, os macrófagos M2 tem fenótipo anti-inflamatório e podem contribuir para o processo de reparo tecidual (Murray & Wynn 2011), liberando fatores de crescimento, como TGF- β e citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-13 (Weber *et al.* 2018).

Além dos fatores inflamatórios locais, o desenvolvimento da periodontite apical pode ser agravado por fatores externos como o tabagismo, que pode ter efeito negativo na resposta inflamatória ou na capacidade de cicatrização dos tecidos periapicais,

contribuindo para um aumento da reabsorção óssea (Segura-Egea *et al.* 2011, Lopez-Lopez *et al.* 2012).

Na cavidade bucal de pacientes tabagistas o número de neutrófilos atingindo o sulco gengival pode estar reduzido (Pauletto *et al.* 2000), sugerindo que os efeitos da fumaça do cigarro, também influencia nas transmigração das células pela microvascularização ao periodonto (Palmer *et al.* 2005). Essas células também estão associadas com a destruição periodontal, já que são consideradas fontes importantes de elastase e metaloproteinasas da matriz (MMPs), que degradam colágeno (Soder *et al.* 2002, Persson *et al.* 2003). Alguns estudos constataram que a presença de macrófagos M1 e M2 aumentam com o tabagismo e a gravidade da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Bazzan *et al.* 2017, Bhatt *et al.* 2018).

A associação entre tabagismo e o agravamento da lesão periapical ainda é controversa. Alguns estudos associam o aumento da prevalência de lesões periapicais em pacientes tabagistas (Kirkevang & Wenzel 2003, Kirkevang *et al.* 2007, Segura-Egea *et al.* 2011, Lopez-Lopez *et al.* 2012), além da redução da taxa de sucesso no tratamento endodôntico (Doyle *et al.* 2007). Por outro lado, outros não correlacionam esses dois fatores (Bergstrom *et al.* 2004, Frisk & Hakeberg 2006, Rodriguez *et al.* 2013, Balto *et al.* 2019).

Portanto, a relação entre tabagismo e progressão da periodontite apical ainda não é totalmente esclarecida na literatura. Baseado na falta de resultados biológicos correlacionando esses fatores, o objetivo do presente estudo foi avaliar a severidade da periodontite apical em ratos expostos à fumaça do cigarro, por meio da análise histopatológica do perfil inflamatório e imunomarcção macrofágica M1 e M2. A hipótese nula testada é de que a fumaça do cigarro não promove alterações na marcação de macrófagos.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado e conduzido de acordo com o Comitê de Ética Animal local (Faculdade de Odontologia, sob o protocolo nº 00247-2020), e em conformidade com as diretrizes de Estudos em Animais em Endodontologia (PRIASE) 2021 (Figura 1) (Nagendrababu *et al.* 2021).

Cálculo do tamanho da amostra

A estimativa do tamanho da amostra foi baseada em dados de um estudo anterior (Dal-Fabbro *et. al* 2019). Considerando o erro alfa de 0,05 e poder de 95% para reconhecer uma diferença significativa, considerou-se necessário sete animais por grupo. Levando em consideração as possíveis mortes de animais, foi adicionado mais um animal em cada grupo, resultando em oito animais por grupo, totalizando 32 animais.

Animais

Foram utilizados trinta e dois ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com 3 meses de idade, pesando 200-250 g cada, alojados em ambiente com temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), ciclo de luz de 12 horas claro e 12 horas escuro, acesso a comida e a água “ad libitum” durante o tempo experimental. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=8): PA (ratos com PA induzida); F (ratos expostos à fumaça do cigarro); FPA (ratos com PA induzida expostos à fumaça do cigarro); C (ratos sem PA e sem exposição ao cigarro). Os animais dos grupos fumantes foram alojados separadamente dos não fumantes.

Inalação da fumaça do cigarro

Os animais do grupo F e FPA inalaram a fumaça dos cigarros, por meio de uma câmara de exposição de corpo inteiro, simulando um fumante passivo (Nociti- Júnior *et al.* 2002, César-Neto *et al.* 2003, Ercan *et al.* 2019).

A câmara de tabagismo foi confeccionada em madeira medindo 40 x 33 x 17 cm³ com tampa de vidro para observação dos animais, dividida em dois compartimentos por uma tela perfurada. O compartimento maior foi usado para alojar os animais, cinco por vez, e o menor para os cigarros, que foram acoplados em uma base de madeira. Em uma das paredes externas da câmara foi instalado um ventilador, e na parede oposta foram realizadas algumas perfurações para ventilação, gerando um fluxo de ar contínuo dentro da câmara de tabagismo.

Os animais foram submetidos a um período de adaptação gradual. Inicialmente inalaram a fumaça de 10 cigarros uma vez ao dia, sendo no primeiro dia pelo tempo de

5 minutos, no segundo dia por 6 minutos e no terceiro dia por 7 minutos (Carvalho *et al.* 2006, Ferreira *et al.* 2018). Após a adaptação, os animais passaram a inalar a fumaça de 10 cigarros, por 8 minutos, três vezes ao dia, 7 dias da semana (Cesár-Neto *et al.* 2003). O cigarro utilizado foi o Marlboro (Phillips Morris, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil) (Rosa *et al.* 2017, Santiago *et al.* 2017) que contêm 10 mg de alcatrão, 10 mg de monóxido de carbono e 0.8 mg de nicotina. Os animais do grupo fumante (F e FPA) inalaram a fumaça dos cigarros 20 dias antes dias da indução da periodontite apical (FPA) e nos outros 30 dias subsequentes, totalizando 50 dias de experimento.

Indução da periodontite apical e coleta das amostras

A indução das lesões periapicais foi realizada sob anestesia geral com Cetamina 75mg/kg⁻¹ IM (Cetamin 10%; Syntec Brasil, São Paulo, Brazil) e Xylazina 25 mg/kg⁻¹ IM (Xilazin 2%; Syntec Brasil). A polpa dentária do primeiro molar superior direito foi exposta ao meio bucal com auxílio de uma broca de aço carbono – Ln Long Neck (Dentsply / Maillefer, Ballaigues, Suíça) pelo tempo de 30 dias para a evolução da lesão (Cintra *et al.* 2016). Após este período, a eutanásia foi realizada e as hemimaxilas do lado direito foram removidas e armazenadas em solução de formaldeído 4%, em pH neutro.

Análise histológica e processamento das amostras

Após 24 horas em formalina, os espécimes foram lavados em água corrente por 12 horas e descalcificados em EDTA tamponado a 10% por 20 dias, lavados novamente em água corrente, processadas em álcool e xilol, e incluídas em parafina. Os espécimes obtidos foram cortados em semissérie de 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE). A raiz distal do primeiro molar superior direito foi padronizada para todas as análises. Para a análise histopatológica foram considerados os parâmetros de reabsorção óssea, biofilme microbiano e infiltrado inflamatório. Na análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório na região periapical atribuíram-se escores, de acordo com a intensidade da inflamação a partir de fotomicrografias do periodonto apical em cortes corados com HE, em aumento de 400x, como se segue: sem inflamação (escore 1: 0 ou poucas células inflamatórias), inflamação leve (score 2: < 25 células inflamatórias), inflamação moderada (escore 3: 25 – 125 células inflamatórias) e

inflamação intensa (escore 4: > 125 células inflamatórias) (Cintra *et al.* 2016; Cantiga-Silva *et al.* 2021).

Análise Imuno-histoquímica

Para avaliação do fenótipo dos macrófagos, três cortes histológicos de cada animal (5 µm de espessura) foram preparados para detectar macrófagos F4/80, macrófagos M1, iNOS (SC # 649), e macrófagos M2, CD206 (SC # 34577). Depois disso, aqueles incubados com anticorpo primário anti-rabbit tratados com polímero HRP (Easy Link One, EasyPath, Immunobioscience Corp, EUA) e aqueles incubados com anti-goat foram tratados com Immpress / HRP (Vector Labs, Southfield, EUA) por 10 a 25 minutos e corados com cloridrato de 3,30-diaminobenzidina tetra (SigmaAldrich, St Louis, MO, EUA) e contra-corados com Hematoxilina Harris. Para a morfometria, foram capturadas 5 campos ao redor do ápice da raiz distal do lado direito (DM 4000B; Leica, Wetzlar, Germany) no aumento de 400x para avaliar a intensidade das células imunorreativas dos macrófagos F4/80 (Bigueti *et al.* 2018), CD206 para macrófagos M1 e INOS para macrófagos M2 (Chen *et al.* 2019; Feng *et al.* 2019, Munerato *et al.* 2019), utilizando o software ImageJ (Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda, EUA) (Munerato *et al.* 2019, Simionato *et al.* 2021). A imunorreatividade positiva foi definida como uma cor acastanhada no citoplasma das células.

Análise estatística

Os dados da imuno-histoquímica foram tratados estatisticamente usando GraphPadInStat e Prism5 (GraphPad, San Diego, EUA). A distribuição de normalidade foi testada por Shapiro-Wilk. Na sequência, foi aplicado o teste não paramétrico Kruskal Wallis seguindo post-hoc Dunn, sendo considerado nível de significância de 5% ($p < 0.05$). E os dados da análise histopatológica foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, sendo considerado nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Observações clínicas

Após a inalação da fumaça os animais ficavam letárgicos e demoravam alguns segundos para a respiração voltar ao normal. Devido a nicotina, os pelos dos animais

expostos à fumaça do cigarro ficaram mais amarelados, em comparação aos animais não expostos. Não foi observado perda de peso dos animais expostos a fumaça do cigarro.

Análise histopatológica

Na região apical da raiz distal do primeiro molar superior direito, os grupos **C** e **F** apresentam ligamento periodontal íntegro, ricamente vascularizado, constituído por feixes de fibras colágenas organizadas, permeadas por células fibroblásticas. Adjacente ao ligamento periodontal apical, observam-se cemento celular e osso alveolar em remodelação. Além disso, notam-se fibras de Sharpey inseridas no cemento e no osso alveolar. Em contrapartida, o grupo **PA** apresenta degeneração pulpar culminando em lesão periapical. Em continuidade com o canal radicular, observa-se área ocupada por intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear neutrofílico. Adjacente, o infiltrado neutrofílico torna-se disperso em meio a leucócitos mononucleares e células pseudo-xantomatosas. Nas áreas mais distantes da lesão, nota-se deposição de fibras colágenas ora desorganizadas, ora paralelas entre si configurando aspecto capsular. O cemento apresenta áreas de reabsorção, bem como o tecido ósseo alveolar. Há presença de biofilme bacteriano no interior do canal radicular apical e na superfície externa desta região. O grupo **FPA** também apresenta degeneração pulpar em continuidade a intenso infiltrado inflamatório neutrofílico focal. Em continuidade, notam-se delicados feixes de fibras colágenas permeado por discreto infiltrado inflamatório mononuclear e numerosos vasos sanguíneos. O cemento e o osso alveolar encontram-se em franco processo de reabsorção.

Análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório

Na região do periodonto apical dos grupos **C** e **F** foram observados eventuais leucócitos, sendo atribuído a eles o escore 1. No entanto, nos grupos **PA** e **FPA** notou-se intensa presença de neutrófilos e leucócitos mononucleares, sendo significativamente maior no grupo **FPA** (escore 4) do que no grupo **AP** (escore 3) ($P < 0,05$) (Figura 2/ Tabela 1).

Análise histomorfométrica da imuno-histoquímica

A análise de macrófagos em geral (F4/80) não apresentou diferenças entre os grupos analisados ($P < 0,05$). Por outro lado, os macrófagos M2 (CD206) revelaram

diferenças estatísticas entre os grupos C e PA, e F e FPA. Na marcação dos macrófagos M1 (iNOS), não houve células imunorreativas nos grupos C e F apresentando apenas diferenças significantes quando comparado aos grupos PA e FPA. Em contrapartida, os grupos PA e FPA apresentaram grande quantidade de células imunorreativas, sendo maior para o grupo FPA ($P < 0,05$) (Figura 3/ Tabela 2/ Gráfico 1).

DISCUSSÃO

As investigações a respeito dos efeitos do uso do tabaco frente infecção endodôntica tem sido alvo de estudos há alguns anos (Aleksejuniene *et al.* 2000, Krall *et al.* 2006, López-López *et al.* 2012, Segura- Egea *et al.* 2011; Pinto *et al.* 2020). No entanto, o presente estudo é o primeiro a avaliar o perfil inflamatório e a polarização macrófagica em lesões periapicais em ratos expostos à fumaça do cigarro. Nossos resultados revelaram que a inalação da fumaça do cigarro agravou o perfil inflamatório e intensificou a marcação macrófagica pró-inflamatória das periodontites apicais induzidas, rejeitando a hipótese nula.

A avaliação do desenvolvimento de infecções bucais, alterações ósseas e inflamação em animais é amplamente utilizado na literatura (Azuma *et al.* 2018, Nociti-Junior *et al.* 2002, Biguetti *et al.* 2020, de Almeida *et al.* 2020, Bueno *et al.* 2021). Neste trabalho, foi escolhido o modelo em ratos para a avaliação dos efeitos da fumaça do cigarro (Cesar-Neto *et al.* 2003, Carvalho *et al.* 2006, Ercan *et al.* 2019), assim como para a indução da periodontite apical (Cintra *et al.* 2016, Dal-Fabbro *et al.* 2019, Cantiga-Silva *et al.* 2021, Dal-Fabbro *et al.* 2021).

Para representar um fumante, foi utilizado o protocolo consolidado em publicações anteriores (Nociti Júnior *et al.* 2002, César-Neto *et al.* 2003), que a inalação da fumaça de 10 cigarros, três vezes ao dia, por 50 dias produz níveis séricos de cotinina semelhantes à fumantes humanos ativos (Gonzalez *et al.* 1996).

Conforme observado no presente estudo, o grupo FPA apresentou maior número de células inflamatórias na região periapical decorrente da inflamação causada pela PA, associado à inalação da fumaça do cigarro. Trabalhos prévios demonstraram que a resposta imune do hospedeiro frente a agentes microbianos pode ser prejudicada em

pacientes tabagistas (Gustafsson *et al.* 2000; Sørensen *et al.* 2004), o que corrobora os resultados apresentados.

No grupo FPA observamos a presença de delicados feixes de fibras colágenas e um franco processo de reabsorção do osso alveolar e do cimento, ao contrário do grupo PA, na qual as fibras colágenas alternavam em desorganizadas e paralelas (aspecto capsular). Devido à escassez de trabalhos na endodontia, encontramos resultados semelhantes em um estudo que avaliou a exposição de furca em ratos nicotínicos com doença periodontal induzida, no qual observaram diminuição de fibras colágenas e reabsorção óssea mais intensa (Bosco *et al.* 2007).

Os resultados desta pesquisa atribuem a destruição intensa dos tecidos periapicais à ação do tabagismo nas células inflamatórias. Um estudo avaliando a influência sistêmica do tabagismo através de análises sanguíneas observaram que a responsividade quimiotática dos neutrófilos assim como sua contagem, foram maiores em fumantes em comparação aos que nunca fumaram (Sørensen *et al.* 2004). Essas células são consideradas fontes importantes de elastase e MMPs, que degradam colágeno (Soder *et al.* 2002, Persson *et al.* 2003). Ainda, o cigarro parece atuar em fibroblastos, alterando seu recrutamento (Palmer *et al.* 2000) e interferindo no reparo (Raulin *et al.* 1988).

Além disso, outras células inflamatórias, como macrófagos, parecem estar relacionadas com as alterações periapicais. Os macrófagos constituem cerca 46% das células inflamatórias encontradas granulomas periapicais humanos (Stern *et al.* 1981) e parece reagir com exposição ao tabaco (Bazzan *et al.* 2017, Bhatt *et al.* 2018). Devido a isso, nosso trabalho avaliou a polarização macrofágica através da técnica de imunohistoquímica, utilizando os seguintes marcadores de macrófagos F4/80 (Bigueti *et al.* 2018), CD206 para macrófagos M1 e INOS para macrófagos M2 (Chen *et al.* 2019; Feng *et al.* 2019, Munerato *et al.* 2019).

Estudos *in vivo* que correlacionam a associação entre periodontite apical e tabagismo ainda é escasso na literatura. Para compreender os mecanismos, avaliamos esses dois fatores separadamente. Nossos resultados apontaram que a quantidade de macrófagos em geral (F4/80) não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0.05$). Por outro lado, ao analisar a polarização macrofágica M1 e M2, observamos

que os macrófagos com fenótipo M2 (CD206) estavam presentes em maiores quantidades nos grupos com presença da lesão periapical (PA e FPA) em comparação aos grupos sem a lesão (C e F). De fato, a literatura mostra que há uma tendência de polarização macrofágica M2 em lesões periapicais, tanto em granulomas periapicais (Weber *et al.* 2018), quanto em cistos radiculares de humanos (Bertasso *et al.* 2020), pois essas células são capazes de modular respostas anti-inflamatórias, com objetivo de reparar tecidos danificados (Bazzan *et al.* 2017).

Além da imunomarcagem de macrófagos com fenótipo M2 nos grupos PA e FPA, identificamos também a presença de macrófagos com fenótipo M1, sugerindo que em lesões crônicas existe uma tentativa de reparo, porém a presença persistente do fator etiológico no local, induz a polarização de macrófagos M1. Dados semelhantes foram encontrados em um estudo avaliando cistos periapicais, no qual foi possível observar presença de macrófagos M2 e citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 (que modulam a polarização de macrófagos M1) no mesmo local (Ribeiro *et al.* 2018). Outro trabalho avaliando cistos radiculares em dentes decíduos e permanentes em humanos, mostrou novamente marcação macrofágica M1 e M2 nas amostras analisadas, porém com predominância de macrófagos M2 (Bertasso *et al.* 2020).

A presença desses dois subtipos é essencial para a resposta imune e controle da infecção, uma vez que a deficiência de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), liberado principalmente por macrófagos M1, resulta em um aumento de abscesso periapical após infecção endodôntica e reabsorção óssea (Fukada *et al.* 2018). Além disso, apenas a presença de macrófagos M2 não é o suficiente para a regressão da lesão periapical, pois a chegada constante de bactérias no local promove a liberação de mais citocinas inflamatórias (Fabriek *et al.* 2009, Ribeiro *et al.* 2018), impedindo o processo de reparo.

Em contrapartida, é importante notar que houve uma descompensação entre macrófagos com fenótipos M1 e M2 no grupo com periodontite apical associado ao fumo (FPA), no qual a presença de macrófagos M1 (iNOS) foi maior que nos demais grupos, o que pode ter alterado a defesa do hospedeiro e influenciado no agravamento da resposta inflamatória local. Esse padrão foi visto em um estudo *in vitro*, através de análises de qPCR, no qual observou que a presença do extrato da fumaça do cigarro (CSE) induziu a polarização de macrófagos M1 de maneira dependente da concentração (Feng *et al.* 2019). Outro estudo apontou o tabagismo como um importante

desencadeador da polarização de macrófagos M1 em pulmões humanos, uma vez que ao remover o tabagismo, o percentual de macrófagos alveolares que expressaram M1 reduziu significativamente (Bazzan *et al.* 2017).

Em resumo, este estudo confirmou que a presença da fumaça do cigarro exacerbou a periodontite apical em ratos. Porém, mais estudos são necessários para um melhor entendimento da polarização macrofágica nessa associação.

CONCLUSÃO

A inalação da fumaça do cigarro em ratos induziu uma reação inflamatória periapical mais intensa, com presença predominante de macrófagos pró-inflamatórios M1, agravando o desenvolvimento da periodontite apical.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Número do auxílio: 2020/06310-5) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Número da bolsa: 131423/2020-7) pelo apoio financeiro.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que a pesquisa foi realizada na ausência de quaisquer relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

Aleksejuniene J, Eriksen HM, Sidaravicius B, Haapasalo M (2000) Apical periodontitis and related factors in an adult Lithuanian population. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* **90**, 95–101.

Araujo-Pires AC, Francisconi CF, Biguetti CC, Cavalla F, Aranha AM, Letra A, Trombone AP, Faveri M, Silva RM, Garlet GP (2014) Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in

periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *Journal of Applied Oral Science* **22**, 336-46.

Azuma MM, Gomes-Filho JE, Ervolino E *et al.* (2018) Omega-3 Fatty Acids Reduce Inflammation in Rat Apical Periodontitis. *Journal of endodontics* **44**, 604–8.

Balto HA, Alabdulaaly L, Bahammam S, Al-Ekrish AA (2019) Comparative analysis of prevalence of apical periodontitis in smokers and non-smokers using cone-beam computed tomography. *The Saudi dental journal* **31**, 52-7.

Bazzan E, Turato G, Tinè M *et al.* (2017) Dual polarization of human alveolar macrophages progressively increases with smoking and COPD severity. *Respiratory research*, **18**, 40.

Bergström J, Babcan J, Eliasson S (2004) Tobacco smoking and dental periapical condition. *European Journal of Oral Sciences* **112**, 115– 20

Bertasso AS, Léon JE, Silva R *et al.* (2020) Immunophenotypic quantification of M1 and M2 macrophage polarization in radicular cysts of primary and permanent teeth. *International endodontic journal* **53**, 627-35.

Bhatt SP, Kim YI, Harrington KF *et al.* (2018) Smoking duration alone provides stronger risk estimates of chronic obstructive pulmonary disease than pack-years. *Thorax* **73**, 414–421.

Bigueti CC, Couto M, Silva A *et al.* (2020) New Surgical Model for Bone-Muscle Injury Reveals Age and Gender-Related Healing Patterns in the 5 Lipoxygenase (5LO) Knockout Mouse. *Frontiers in endocrinology* **11**, 484.

Bigueti CC, Vieira AE, Cavalla F (2018). CCR2 Contributes to F4/80+ Cells Migration Along Intramembranous Bone Healing in Maxilla, but Its Deficiency Does Not Critically Affect the Healing Outcome. *Frontiers in immunology* **9**, 1804.

Bosco AF, Bonfante S, de Almeida JM, Luize DS, Nagata MJ, Garcia VG (2007) A histologic and histometric assessment of the influence of nicotine on alveolar bone loss in rats. *Journal of periodontology* **78**, 527–532.

Bueno CRE, Sumida DH, Duarte MAH *et al.* (2021) Accuracy of radiographic pixel linear analysis in detecting bone loss in periodontal disease: Study in diabetic rats. *In Press The Saudi Dental Journal*.

Cantiga-Silva C, Estrela C, Segura-Egea JJ *et al.* (2021) Inflammatory profile of apical periodontitis associated with liver fibrosis in rats: histological and immunohistochemical analysis. *International Endodontic Journal* **54**, 1353-1361.

Carvalho MD, Benatti BB, César-Neto JB, *et al.* (2006) Effect of cigarette smoke inhalation and estrogen deficiency on bone healing around titanium implants: a histometric study in rats. *Journal of Periodontology* **77**, 599-605.

César-Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Barbieri D, Moreno H Jr, Nociti FH Jr (2003) A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *Journal of Periodontology* **74**,1454-9.

Chen SY, Chiang CF, Chiu KC *et al.* (2019) Macrophage phenotypes and Gas6/Axl signaling in apical lesions. *Journal of dental sciences* **14**, 281–87.

Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM *et al.* (2016) Multiple Apical Periodontitis Influences Serum Levels of Cytokines and Nitric Oxide. *Journal of Endodontics* **42**, 747-51.

Cintra LTA, Estrela C, Azuma MM, Queiroz ÍOA, Kawai T, Gomes-Filho JE (2018) Endodontic medicine: interrelationships among apical periodontitis, systemic disorders, and tissue responses of dental materials. *Brazilian Oral Research* **32**(Suppl. 1), e68.

Dal-Fabbro R, Cosme-Silva L, Rezende Silva Martins de Oliveira F *et al.* Effect of red wine or its polyphenols on induced apical periodontitis in rats (2021). *International Endodontic Journal*, 00, 000– 000. (Online ahead of print)

Dal-Fabbro R, Marques-de-Almeida M, Cosme-Silva L, Ervolino E, Cintra LTA, Gomes-Filho JE (2019) Chronic alcohol consumption increases inflammation and osteoclastogenesis in apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **52**, 329-336.

de Almeida JM, Pazmino V, Novaes V *et al.* (2020) Chronic consumption of alcohol increases alveolar bone loss. *PloS one* **15**, e0232731.

Doyle SL, Hodges JS, Pesun IJ, Baisden MK, Bowles WR (2007) Factors affecting outcomes for single-tooth implants and endodontic restorations. *Journal of Endodontics* **33**, 399–402.

Ercan A, Baghaki S, Suleymanov S, Aydın O, Konukoglu D, Cetinkale O (2019) Effects of Cigarette Smoke on Fat Graft Survival in an Experimental Rat Model. *Aesthetic Plastic Surgery* **43**, 815-825.

Fabriek BO, Dijkstra CD, van den Berg TK (2005) The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology*, **210**, 153–160.

Feng H, Yin Y, Ren, Y *et al.* (2020) Effect of CSE on M1/M2 polarization in alveolar and peritoneal macrophages at different concentrations and exposure in vitro. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* **56**, 154–64.

Ferreira CL, Nunes C, Bernardo DV *et al.* (2018) Effect of orthodontic force associated with cigarette smoke inhalation in healthy and diseased periodontium. A histometric and immunohistochemistry analysis in rats. *Journal of periodontal research* **53**, 924–31.

França GM, do Carmo AF, Costa-Neto H, de Andrade ALDL, de Lima KC, Galvão HC (2019) Macrophages subpopulations in chronic periapical lesions according to clinical and morphological aspects. *Brazilian Oral Research* **33**, e047.

Frisk F, Hakeberg M (2006) Socio-economic risk indicators for apical periodontitis. *Acta Odontologica Scandinavica* **64**, 123–8.

Fukada SY, Silva TA, Saconato IF *et al.* (2008) iNOS-derived nitric oxide modulates infection-stimulated bone loss. *Journal of dental research* **87**, 1155–59.

Gonzalez YM, De Nardin A, Grossi SG, Machtei EE, Genco RJ, DeNardin E (1996) Serum cotinine levels, smoking, and periodontal attachment loss. *Journal Dental Research* **75**, 796-802.

Gustafsson A, Asman B, Bergström K (2000) Cigarette smoking as an aggravating factor in inflammatory tissue-destructive diseases. Increase in tumor necrosis Factor- α priming of peripheral neutrophils measured as generation of oxygen radicals. *International journal of clinical & laboratory research* **30**, 187–190.

Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H (1996) Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *Journal of endodontics* **22**, 311–16.

Kirkevang L-L, Wenzel A (2003) Risk indicators for apical periodontitis. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* **31**, 59–67.

Kirkevang L-L, Væth M, Hörsted-Bindslev P, Bahrami G, Wenzel A (2007) Risk factors for developing apical periodontitis in a general population. *International Endodontic Journal* **40**, 290–9.

Krall EA, Sosa CA, Garcia C, Nunn ME, Caplan DJ, Garcia RI (2006) Cigarette smoking increases the risk of root canal treatment. *Journal of Dental Research* **85**, 313-7

López-López J, Jané-Salas E, Martín-González J *et al.* (2012) Tobacco smoking and radiographic periapical status: a retrospective case-control study. *Journal of endodontics* **38**, 584–88.

Metzger Z (2000) Macrophages in periapical lesions. *Endodontics & dental traumatology* **16**, 1–8.

Munerato MS, Bigueti CC, Parra da Silva RB (2020). Inflammatory response and macrophage polarization using different physicochemical biomaterials for oral and maxillofacial reconstruction. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* **107**, 110229.

Murray PJ, Wynn TA (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews. Immunology* **11**, 723–37.

Nagendrababu V, Kishen A, Murray PE, Nekoofar MH, de Figueiredo JA, Priya E, Jayaraman J, Pulikkotil SJ, Camilleri J, RM S, Dummer PMH (2021) PRIASE 2021 guidelines for reporting animal studies in Endodontology: a consensus-based development. *International Endodontic Journal* **54**, 848-57.

Nociti Júnior FH, Cesar Neto JB, Carvalho MD, Sallum EA, Sallum AW (2002) Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *Journal of periodontology* **73**, 982–987.

Oishi Y, Manabe I (2016) Macrophages in age-related chronic inflammatory diseases. *NPJ aging and mechanisms of disease* **2**, 16018.

Palmer RM, Wilson RF, Hasan AS, Scott DA (2005) Mechanisms of action of environmental factors--tobacco smoking. *Journal of clinical periodontology* **32**, 180-95.

Pauletto NC, Liede K, Nieminen A, Larjava H, Uitto VJ (2000) Effect of cigarette smoking on oral elastase activity in adult periodontitis patients. *Journal of periodontology* **71**, 58–62.

Persson L, Bergström J, Gustafsson A (2003) Effect of tobacco smoking on neutrophil activity following periodontal surgery. *Journal of periodontology* **74**, 1475-82.

Pinto KP, Ferreira CM, Maia LC, Sassone LM, Fidalgo T, Silva E (2020) Does tobacco smoking predispose to apical periodontitis and endodontic treatment need? A systematic review and meta-analysis. *International endodontic journal* **53**, 1068–1083.

Raulin LA, McPherson JC 3rd, McQuade MJ, Hanson BS (1988) The effect of nicotine on the attachment of human fibroblasts to glass and human root surfaces in vitro. *Journal of periodontology* **59**, 318–25.

Ribeiro CM, de Carli ML, Nonogaki, S *et al.* (2018) M2 macrophages coexist with a Th1-driven profile in periapical cysts. *International endodontic journal* **51**, e87–e93.

Rodriguez FR, Taner B, Weiger R, Walter C (2013) Is smoking a predictor of apical periodontitis? *Clinical Oral Investigations* **17**, 1947–55.

Rosa RC, Pereira SC, Cardoso FAG, Caetano AG, Santiago HAR, Volpon JB (2017) Second hand tobacco smoke adversely affects the bone of immature rats. *Clinics* (Sao Paulo) **72**, 785-89

Santiago HA, Zamarioli A, Sousa Neto MD, Volpon JB (2017) Exposure to Secondhand Smoke Impairs Fracture Healing in Rats. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **475**, 894-902.

Segura-Egea JJ, Castellanos-Cosano L, Velasco-Ortega E *et al.* (2011) Relationship between smoking and endodontic variables in hypertensive patients. *Journal of Endodontics* **37**, 764–7.

Simionato GB, da Silva ACR, Oliva AH *et al.* (2021) Lack of 5-lipoxygenase in intramembranous and endochondral 129Sv mice skeleton and intramembranous healing. *Archives of oral biology* **131**, 105266.

Söder B, Jin LJ, Wickholm S (2002) Granulocyte elastase, matrix metalloproteinase-8 and prostaglandin E2 in gingival crevicular fluid in matched clinical sites in smokers and non-smokers with persistent periodontitis. *Journal of clinical periodontology* **29**, 384-91.

Sørensen LT, Nielsen HB, Kharazmi A, Gottrup, F (2004) Effect of smoking and abstinence on oxidative burst and neutrophil and monocyte reactivity. *Surgery* **136**, 1047- 53.

Stern MH, Dreizen S, Mackler BF, Selbst AG, Levy BM (1981) Quantitative analysis of cellular composition of human periapical granuloma. *Journal of Endodontics* **7**, 117-22.

Tarique AA, Logan J, Thomas E, Holt PG, Sly PD, Fantino E (2015) Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* **53**(5):676-688.

Thuller K, Armada L, Valente MI, Pires FR, Vilaça C, Gomes CC (2021) Immunoexpression of Interleukin 17, 6, and 1 Beta in Primary Chronic Apical Periodontitis in Smokers and Nonsmokers. *Journal of endodontics* **47**, 755–61.

Weber M, Schlittenbauer T, Moebius P *et al.* (2018) Macrophage polarization differs between apical granulomas, radicular cysts, and dentigerous cysts. *Clinical Oral investigations* **22**, 385-94.

LEGENDA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxograma do PRIASE 2021.

Figura 2 Aspectos histológicos da região periapical (HE). Grupo C (a, a1); Grupo F (b, b1); Grupo PA (c, c1) e grupo FPA (d, d1). (a – d: aumento de 100x; a1 - d1: 400x).

Figura 3 Imagens representativas da imuno-histoquímica dos marcadores macrofágicos: CD206 (M2), INOS (M1) e F4/80 (Macrófagos). Grupo C (controle); Grupo F (expostos a fumaça do cigarro); Grupo PA (periodontite apical) e grupo FPA (periodontite apical e exposição a fumaça do cigarro) (aumento de 100x).

Tabela 1 Valores dos escores do infiltrado inflamatório

Critério	Grupos Experimentais				Análise estatística
	C	F	PA	FPA	
Histológico					
Infiltrado					Mann-Whitney
Inflamatório	1 (1-1)	1 (1-1)	3 (3-4) ^a	4 (3-4) ^b	p = 0.038

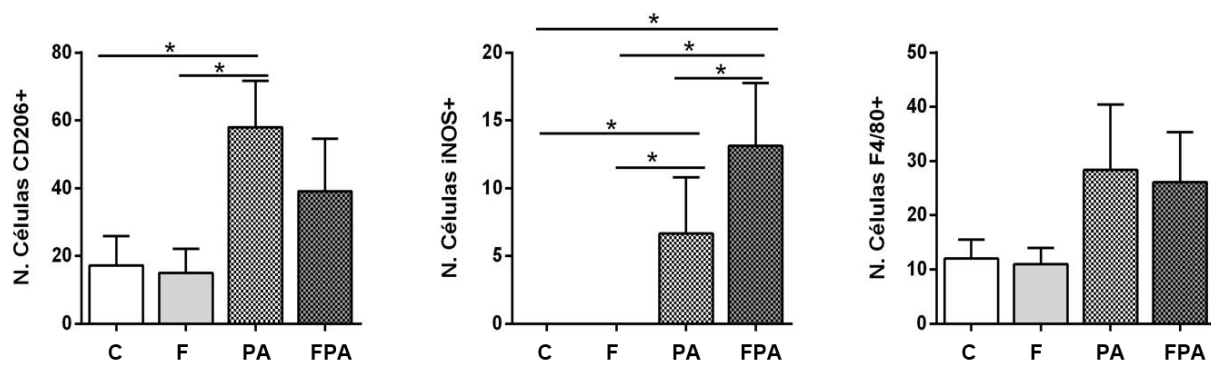
* Letras sobrescritas diferentes representam diferença estatística entre os grupos (PA vs. FPA).

Tabela 2 Os resultados são apresentados como média (\pm SD) e desvio padrão para cada parâmetro imuno-histoquímico

Critérios Histológicos	Grupos Experimentais				Análise estatística
	C	F	PA	FPA	
F4/80	12.00 \pm 3.55 ^a	11.00 \pm 3.00 ^a	28.33 \pm 12.14 ^a	26.13 \pm 9.17 ^a	Kruskal Wallis (p<0.05)
CD206	17,25 \pm 8,66 ^a	15 \pm 7,07 ^a	58 \pm 13,62 ^b	39 \pm 15,6 ^a	
iNOS	0 ^a	0 ^a	4,67 \pm 4,13 ^b	13,13 \pm 4,64 ^c	

* Letras sobrescritas diferentes representam diferença estatística entre os grupos.

Gráfico 1 Análise imuno-histoquímica dos marcadores macrófagos CD206 (M2), INOS (M1) e F4 / 80 (Macrófagos).



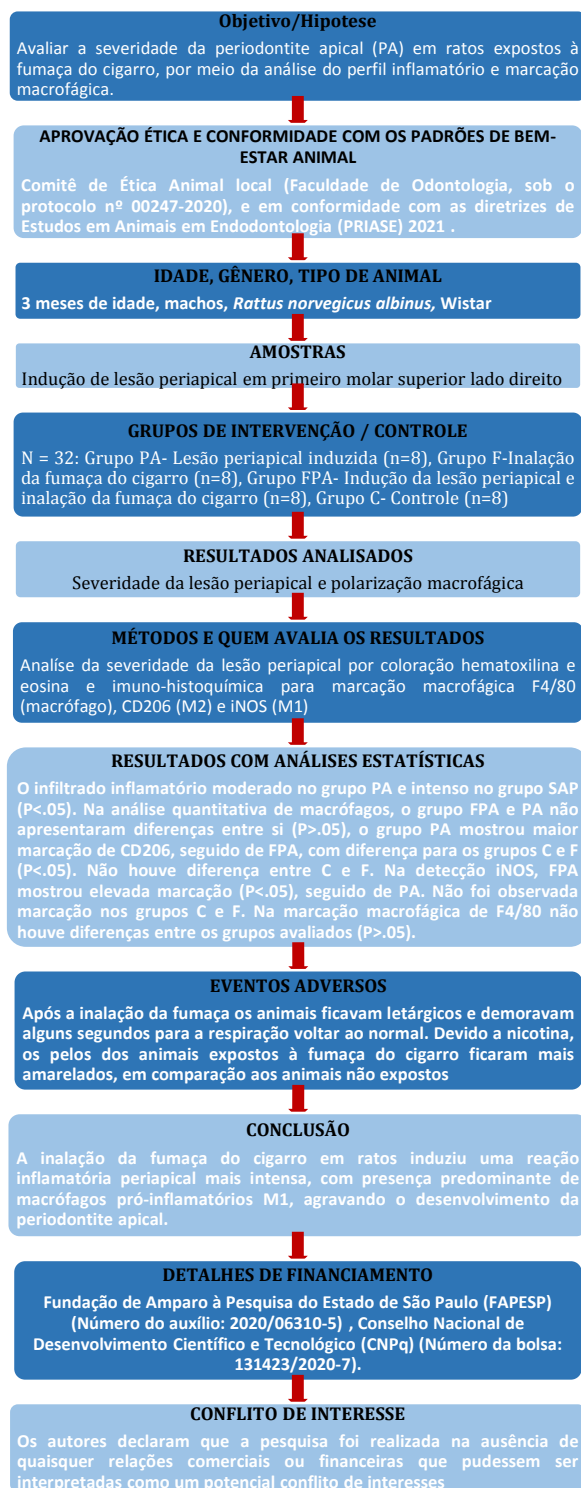


Figura 1

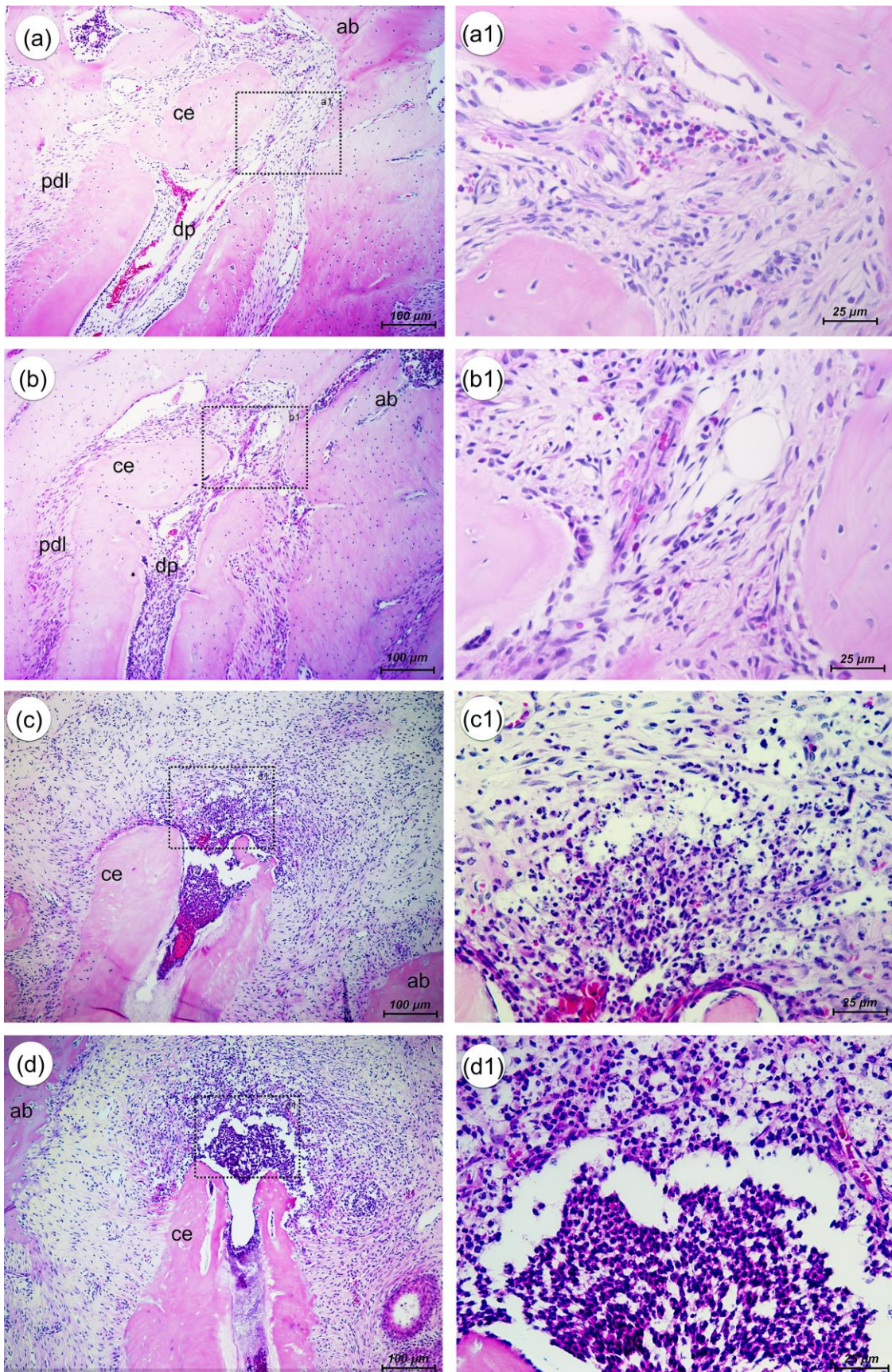


Figura 2

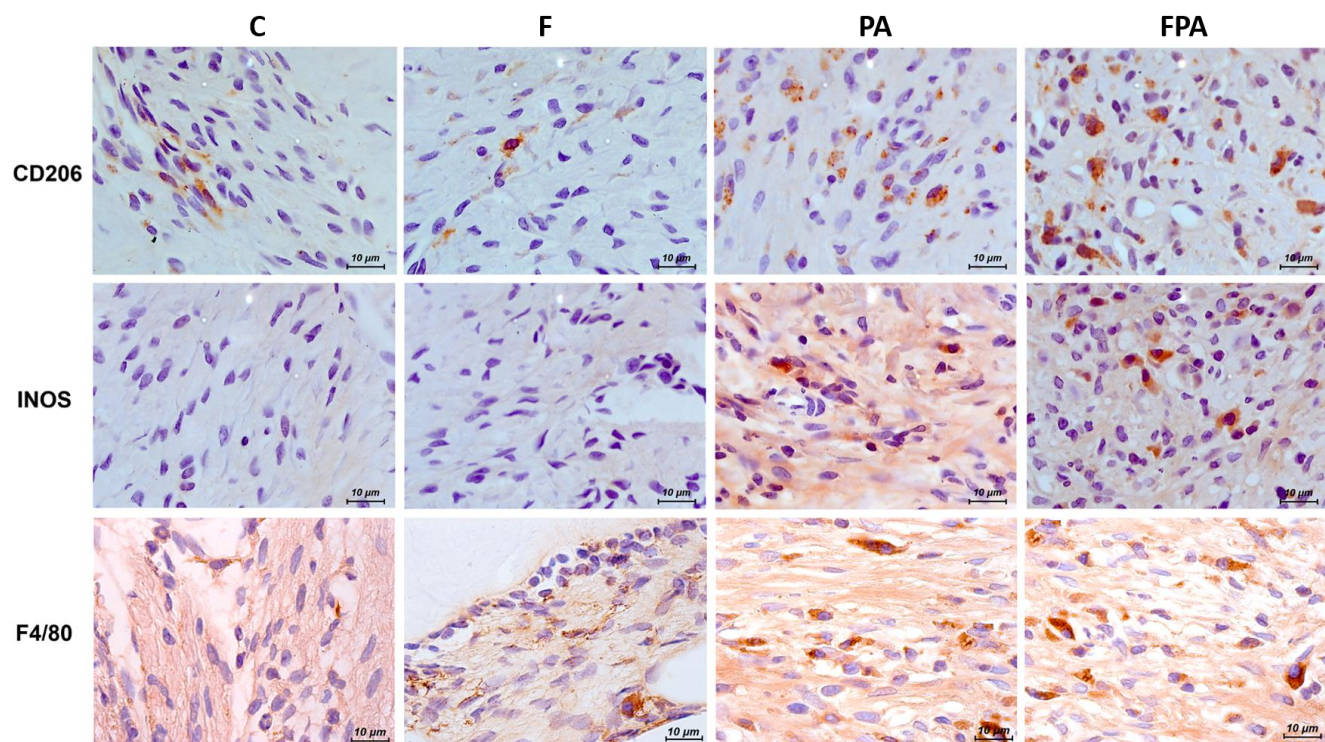
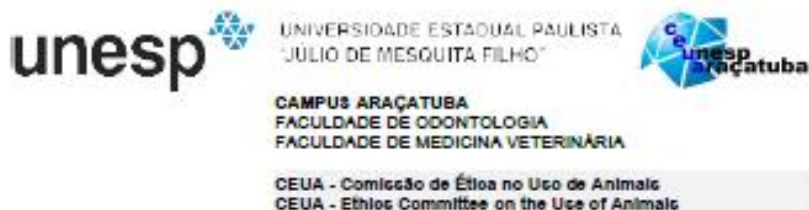


Figura 3

ANEXO A- Comitê de Ética



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Influência do tabaco no desenvolvimento da periodontite apical em ratos", Processo FOA nº 00247-2020, sob responsabilidade de Eloi Dezan Júnior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 01 de Dezembro de 2020.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Novembro de 2022.


DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Dezembro de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Influence of tobacco in apical periodontitis development", Protocol FOA nº 00247-2020, under the supervision of Eloi Dezan Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 01, 2020.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: November 01, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: December 01, 2022.


Prof. Associado Guilherme de Paula Nogueira
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, 1150 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3638-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br