



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

CÂMPUS DE ARAÇATUBA-FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA

DISCIPLINA DE ENDODONTIA

MARINA OTTONI MARTINS

Influência da periodontite apical no perfil hematológico de
ratos Wistar portadores de Aterosclerose.

Estudo preliminar.

ARAÇATUBA-SP

2018

MARINA OTTONI MARTINS

Influência da periodontite apical no perfil hematológico de
ratos Wistar portadores de Aterosclerose.

Estudo preliminar.

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Bacharel em
Odontologia da Faculdade de Odontologia de
Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra

ARAÇATUBA-SP

2018

Dedicatória

Ofereço essa conquista à Deus

Que me deu a vida e a oportunidade de estar onde estou. Sempre me deu forças nos momentos em que me senti mais fraca, guiando meus passos e me protegendo sempre. Me legou pais maravilhosos e uma família inigualável. Colocou em meu caminho pessoas especiais, em quem busquei auxílio sempre que precisava.

À minha família

À minha mãe Ana Paula, e meu pai José Saul

Aqueles que nunca mediram esforços para me ver feliz, e sempre dar o melhor pra mim. Sei que abriram mão de muita coisa para poder me conceder um bom estudo e ter meu sonho realizado. São meus espelhos, quero que um dia eu tenha uma família e possa ser metade do que eles são. Quando tudo parecia dar errado, era a eles quem eu recorria e pedia ajuda. São meu alicerce, e estiveram junto em todos os momentos de minha vida
Muito obrigada, vocês são incríveis.

À minha irmã Laura

Mesmo com nossas diferenças, saiba que tenho você em meu coração, e que onde estiver e precisar de mim saiba que estarei ao seu lado.

À minha avô paterna Vanir

Foi ela que sempre esteve comigo, desde que nasci. Tenho certeza que está muito orgulhosa vendo eu me formar e alcançar meu sonhos. Essa conquista também é da senhora!

Aos meus avôs maternos Raul e Zilda

Sempre que preciso sei que posso contar com eles, os pequenos gestos representam muito, vocês me fazem muito feliz.

Ao meu amor José Luís

Quem sempre esteve ao meu lado, me ouvindo, apoiando, dando toda atenção e amor. Porque você me fez acreditar que eu poderia chegar até aqui, me mostrando o caminho com paciência e amor. Caminhar ao seu lado deixou tudo mais fácil e leve. Estendo meu agradecimento aos seus pais, José e Sílvia, pelo carinho que tem por mim.

Agradecimentos Especiais

*Agradeço em primórdio, ao meu orientador **Luciano Tavares Angelo Cíntra**, por todos ensinamentos e paciência que teve comigo, sem o senhor nada disso aconteceria. Por ser esse profissional competente, dedicado e tão pontual. Aprendi muito com o senhor, obrigada pela oportunidade de fazer parte dos seus orientados, com certeza é exemplo para todos.*

*À querida amiga **Letícia Cíbelli Contí**, que tem sido exemplo de determinação. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos comigo de forma tão gentil, por estar sempre tão disposta a ajudar. Por me mostrar o caminho da melhor forma, ser tão presente e me atender sempre de prontidão. Sem sua ajuda eu não teria conseguido, você foi inigualável. Que sua trajetória seja brilhante, e muito abençoada. Continue sempre essa pessoa gentil e dedicada, são poucas pessoas como você hoje em dia. Seu futuro é sucesso garantido.*

*Ao professor **Celso Koogi Sonoda**, por me ensinar tanto em tão pouco tempo, e fazer as coisas sempre com tamanha dedicação e amor. Quando o senhor está operando fica claro, como ama o que faz. Me inspiro muito no senhor, é um exemplo para mim e todos seus alunos.*

*À querida amiga **Carolina Barros**, que estava sempre disposta a ajudar, e tornar o ambiente sempre descontraído e leve. Seu coração é enorme Carol, e pessoas assim merecem tudo de melhor que a vida pode oferecer.*

À minha amiga irmã Taís, sem você aqui eu nem sei como seria, não teria pessoa melhor para ter ao meu lado durante todos esses anos. Com você vivi meus melhores momentos dentro da faculdade. Desejo que o mundo seja tão acolhedor com você, assim como você é comigo. Essa conquista se tornou mais fácil com você ao meu lado. Saiba que sempre vai poder contar comigo! Obrigada por tudo, sentirei saudade.

À minha amiga irmã Elisa, que dividiu o lar comigo durante a graduação, nossas diferenças se completavam, você com esse seu coração enorme, foi onde encontrei moradia. Sei que posso contar sempre, em qualquer situação. Desejo que sua vida seja linda e seu caminho seja sereno e repleto de realizações. O futuro tem muitas coisas reservadas pra você. Sem você minha caminhada seria bem mais difícil. Obrigada por ser exatamente assim.

Às amigas Camila, Anelise e Yasmín, agradeço pela oportunidade de termos convívio alguns anos. Sobre vocês, tenho a indubitável certeza de um futuro repleto de realizações que merecem.

Agradecimentos

*À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP, pela oportunidade de cursar Odontologia em uma das
Universidades mais reconhecidas do país.*

*À Disciplina de Endodontia e ao Departamento de Odontologia
Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho -
UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.*

*Ào Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
(PIBIC), pela concessão da bolsa de iniciação científica.*

*A todos os meus professores da Graduação, que foram e são tão
importantes para a excelente formação dos alunos desta
Universidade.*

Martins, MO **Influência da periodontite apical no perfil hematológico de ratos Wistar portadores de Aterosclerose. Estudo preliminar.** 2018. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi analisar a influência da periodontite apical (PA) no perfil hematológico de ratos normais ou com aterosclerose (AT). Foram utilizados 40 ratos Wistar distribuídos em 4 grupos de 10 animais: C - ratos controle; PA - ratos com periodontite apical; AT - ratos com aterosclerose; PA+AT - ratos com periodontite apical e com aterosclerose. A indução da aterosclerose foi realizada cirurgicamente, por meio de uma amarra em torno da artéria carótida comum com diâmetro interno da estenose de 0,3mm. Um dia depois da cirurgia, foi administrado via oral uma dose de vitamina D₃ durante dois dias (90.000 UI). Os animais induzidos cirurgicamente se alimentaram com uma dieta hiperlipídica, composta por ração convencional associada a 20% de banha de porco e 5% de açúcar durante todo o período experimental. Após 30 dias, a periodontite apical foi induzida pela exposição da polpa coronária dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores direito ao meio oral. Decorridos mais 30 dias, foi realizada punção cardíaca para remoção do tecido hematológico e em seguida os animais foram eutanasiados. O material coletado foi analisado por meio do hemograma cujos parâmetros analisados foram: hemácias, volume globular (hematócrito), hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e proteína plasmática total (PPT). Os resultados obtidos foram analisados, do ponto de vista estatístico pelos testes de Kruskal Wallis e Dunn com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Houve redução no número de leucócitos e basófilos nos grupos com aterosclerose (AT e PA+AT), porém sem diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). O grupo PA+AT apresentou menor valor de neutrófilos, porém sem diferença significativa comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Observou-se menor quantidade de monócitos nos grupos que apresentavam alterações isoladas ou associadas (PA, AT e PA+AT), quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). Eosinófilos e a Proteína Plasmática Total reduziram significativamente nos grupos com aterosclerose com relação ao grupo controle ($p < 0,05$). A contagem de linfócitos aumentou nos animais do grupo PA+AT quando comparados aos demais grupos, porém sem diferença estatística ($p < 0,05$). Conclui-se que a periodontite apical quando associada com a aterosclerose interfere no perfil hematológico e pode alterar o metabolismo de ratos Wistar.

Palavras-Chave: Periodontite apical, aterosclerose, hemograma, alterações pulpare, alterações periapicais, medicina endodôntica.

Martins, MO. 2018. **Influence of apical periodontitis on the hematological profile of Wistar rats with Atherosclerosis. Preliminary study.** Trabalho de Conclusão de Curso- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

Abstract

This study evaluated the influence of apical periodontitis (PA) on the hematological profile of normal or atherosclerosis (AT) rats. Forty male Wistar rats were distributed in 4 groups of 10 animals: control rats (C); rats with apical periodontitis (PA); rats with atherosclerosis (AT); rats with AP and atherosclerosis (PA+AT). Atherosclerosis was induced surgically, by means of an artificial ligation made around the common carotid artery stenosis inner diameter of 0.3mm. One day after surgery, it was administered a dose of vitamin D₃ for two days (90,000 IU). The surgically induced animals were fed a hyperlipid diet consisting of a conventional diet associated with 20% lard and 5% sugar throughout the experimental period. After 30 days, the apical periodontitis was induced by exposing the coronary pulp of the first and second upper and lower right molars to the oral medium. After another 30 days, cardiac puncture was performed to remove the hematological tissue, and then the animals were euthanized. Hemoglobin, hemoglobin, hemoglobin, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (CHCM), leukocytes, neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, basophils, platelets, and total plasma protein (PPT). The results obtained were statistically analyzed by Kruskal Wallis and Dunn tests with a significance level of 5% ($p < 0.05$). There was a reduction in the number of leukocytes and basophils in the groups with atherosclerosis (AT and PA+AT), but without significant difference between groups ($p < 0.05$). The PA+AT group had a lower neutrophil value, but no significant difference compared to the other groups ($p < 0.05$). There were fewer monocytes in the groups presenting isolated or associated alterations (PA, AT and PA+AT), when compared to the control group ($p < 0.05$). Eosinophils and Total Plasma Protein significantly reduced in the atherosclerosis groups relative to the control group ($p < 0.05$). The lymphocyte count increased in the PA+AT group when compared to the other groups, but without statistical difference ($p < 0.05$). We conclude that apical periodontitis when associated with atherosclerosis interferes with the hematological profile and may alter the metabolism of Wistar rats.

Key words: Apical periodontitis, atherosclerosis, blood count, pulp changes, periapical changes, endodontic medicine.

S U M Á R I O

Páginas

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2- PROPOSIÇÃO	16
3- MATERIAL E MÉTODOS	17
4- ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
5- RESULTADOS	21
6- DISCUSSÃO	22
7- CONCLUSÃO	24
8- REFERÊNCIAS	24
9- ANEXOS	29

1 - Introdução e justificativa

As doenças cardiovasculares, de acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde) causou a maior porcentagem de morte no ano de 2008 (Paho/Who, 2016). Dentre essas doenças, podemos citar a Aterosclerose que ocorre devido ao enrijecimento das artérias de médio e de grande calibre (Lönn et al., 2012) por meio de inflamação que acomete a parede da artéria (Ross, 1999; Libby, 2002; Verma et al., 2002).

Este processo inflamatório é caracterizado por um aumento da produção de mediadores da inflamação e trombose (Allahverdian et al., 2012). Essa doença é dirigida pelo sistema imunológico inato e adquirido. A resposta inflamatória é guiada por meio da biossíntese de interleucinas e citocinas (Van et al., 2009).

De acordo com estudos, acredita-se que a aterogênese desenvolve a partir de uma lesão inicial do endotélio, que ocorre devido a um distúrbio no fluxo sanguíneo, causado pela presença de lipídeos oxidados ou pela presença de agentes infecciosos (Lou-Bonafonte et al., 2012), que pode estar associada a fatores de riscos como a diabetes, hipertensão, colesterol elevado, obesidade e distúrbios metabólicos (Husain, 2015).

Podemos destacar que essa doença tende a ser a principal causadora de mortes até o ano de 2020 (Scott, 2002). O endotélio lesionado gera uma condição inflamatória sub-clínica crônica, que é responsável por provocar uma constante liberação de citocinas pró-inflamatórias, infiltração de monócitos, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e oxidação de moléculas de lipídios, colesterol e proteínas presentes na lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Iwata e Nagai, 2012). Como resposta, formam-se placas ou estrias de gorduras, chamadas de ateromas. As placas de gordura são compostas principalmente por células sanguíneas, células espumosas, lipídeos e cálcio (Ravnskov, 1998). Já os ateromas geram uma expansão vascular, podendo restringir o fluxo de sangue e em caso de ruptura da parede vascular, acabam por originar coágulos com consequente isquemia (Lönn, Dennis e Stocker, 2012). Sendo assim, essa desordem cardiovascular pode causar a obstrução e a ruptura das artérias ateroscleróticas, geralmente causando enfarte do miocárdio, enquanto que o bloqueio do fluxo sanguíneo das artérias carótidas pode causar acidente vascular cerebral (Davies, 2000).

Assim como a aterosclerose, as infecções dentárias também são consideradas doenças inflamatórias. Dentre elas, está a infecção endodôntica que resulta no desenvolvimento da periodontite apical (Colic et al., 2010) que é caracterizada, por um infiltrado inflamatório crônico granulomatoso, rico em células inflamatórias (Lukic et al., 2008). A periodontite apical é desencadeada por uma resposta do hospedeiro ao estímulo

antigênico contínuo provindo dos canais radiculares contaminados (Zhang et al., 2005; Xiong et al., 2009). Essa resposta do hospedeiro está relacionada ao recrutamento de uma grande quantidade de células inflamatórias e a participação de uma extensa rede de mecanismos imunológicos (Colic et al., 2009; Xiong et al., 2009).

Sabe-se que a periodontite apical está instalada em 22-65% dos dentes com tratamento endodôntico (De Moor et al., 2000; Dugas et al., 2003; Siqueira et al., 2005) e que as infecções orais vêm sendo cada vez mais pesquisadas de acordo com as suas relações sistêmicas (Segura-Egea et al., 2012; Cintra et al., 2013ab; Gomes et al., 2013; Cintra et al., 2014abc). Entretanto, as infecções endodônticas tem menos enfoque em pesquisas sistêmicas quando comparadas as doenças periodontais (Mylona et al., 2012). A literatura relata que a presença de doença periodontal foi capaz de aumentar os níveis da proteína C reativa, que é um marcador que pode ser utilizado para prever a ocorrência de doenças cardiovasculares (Tapashetti et al., 2014; Etemadifar et al., 2015). Um fato muito alarmante declarado em estudos mostrou que a doença periodontal, quando presente no indivíduo se correlaciona com o risco da aterosclerose se desenvolver no paciente (Kudo et al., 2015; Bartova et al., 2014; López, 2014). Esses achados, evidenciam que pode existir relações entre doenças sistêmicas, como a aterosclerose, com outros tipos de problemas odontológicos.

Já foi observado pelo nosso grupo de pesquisa que ratos normoglicêmicos e ratos diabéticos quando associados com a infecção endodôntica e com a doença periodontal pode influenciar os níveis de triglicérides (Cintra et al. 2013a), creatinina (Cintra et al. 2013b), hemoglobina glicada (Cintra et al. 2013c), 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., 2013; Astolphi et al., 2015). Outros achados do nosso grupo, evidenciaram que a presença de quatro periodontites apicais foi capaz de aumentar os níveis de triglicérides (Cintra et al. 2013d), células inflamatórias (Cintra et al. 2013e), e mediadores pró-inflamatórios, como IL-17, IL-6, IL-23E, TNF- α e óxido nítrico (Cintra et al., 2016 in press) no sangue de ratos, o que sugere que a presença de periodontites apicais pode comprometer a homeostasia de um organismo.

Ao se tratar de análise hematológica, estudos anteriores verificaram que a periodontite apical é capaz de provocar algumas alterações no tecido hematológico

(Cintra et al., 2014, 2016), da mesma forma a literatura relata que a aterosclerose também é capaz de provocar diversas alterações metabólicas (Tedgui, Mallat, 2006; Weber et al., 2008; Ait-Oufella et al., 2011). Sendo assim, é importante analisar o perfil sanguíneo por meio do hemograma, já que este exame permite a avaliação da série branca e série vermelha, tanto quantitativamente quanto qualitativamente (Odagiri et al., 2011; Cintra et al., 2016). Esse conjunto de parâmetros facilita o diagnóstico de doenças, possibilita a verificação da resposta do indivíduo à infecção e até mesmo a progressão de um tratamento (Gkrania-Klotsas et al., 2010).

Tendo em vista que a resposta imunológica da doença periodontal é semelhante ao da periodontite apical (Rupf et al. 2000) e que ambas as doenças apresentam relação no comprometimento sistêmico (Silva et al., 2007), a proposta do presente estudo foi avaliar a influência da periodontite apical (PA) no perfil hematológico de ratos com aterosclerose.

2 - Proposição

2.1 – Proposição geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência da periodontite apical (PA) no perfil hematológico de ratos com aterosclerose.

2.2 – Proposição específica

Analisar o perfil hematológico, por meio de hemograma, observando as possíveis alterações que podem ocorrer a nível de hemácias, volume globular, hemoglobina, VCM, CHCM, leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e proteína plasmática total;

Identificar qual ou quais parâmetros são influenciados pela presença da periodontite apical e aterosclerose isoladas ou em associação.

3 - Material e métodos

Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP, pesando aproximadamente 250g. Os animais foram 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 e mantidos em mini-isoladores individuais. 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 utilizados neste estudo foram aprovados previamente pelo comitê de conduta ética em experimentação animal (CEEA / FOA-00358- 2016).

3.1. Indução da aterosclerose

Metade dos animais (20 ratos) foram anestesiados via intramuscular, à base de Xilazina 2% (relaxante muscular, analgésico e sedativo, Xilazin, Syntec do Brasil LTDA-Cotia, São Paulo, Brasil- 10mg/ml) e de Cloridrato de Cetamina a 10% (Ketamina Agener 10%, União Química Farmacêutica Nacional S/A- Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil- 80mg/Kg), via intramuscular. Foi realizada tricotomia e assepsia com Iodopovidona (PVPI) na região a ser operada. Os animais foram posicionados em mesas cirúrgicas para ratos em posição supina e uma incisão foi realizada na linha média do pescoço, na altura do plexo carotídeo. A artéria carótida foi isolada com instrumento afastador com o intuito de não causar danos às estruturas anatômicas adjacentes e um fio de sutura não absorvível (Seda, 5-0 - Ethicon Johnson e Johnson, São Paulo – SP, Brazil) foi posicionado sob o vaso. Em seguida, uma agulha de insulina estéril, com diâmetro externo de 0,3 mm, foi posicionada sobre e paralelamente a artéria isolada. Uma amarria foi confeccionada a uma distância de 1,5 cm do arco aórtico, de maneira que causasse um estrangulamento, a fim de promover uma estenose carotídea. A agulha foi removida e a sutura permaneceu em torno do vaso, que passou a ter um calibre interno de aproximadamente 0,3 mm, a fim de facilitar a formação de ateromas (Wang, 2015; Nam, 2009; Hua, 2006). Em seguida, os tecidos foram aproximados e realizou-se a sutura com pontos interrompidos empregado fio não absorvível (Nylon, 5-0 - Ethicon Johnson e Johnson, São Paulo – SP, Brazil).

A outra metade dos animais (20 ratos) também passaram pelo procedimento cirúrgico, com o intuito de promover um stress cirúrgico semelhante, porém a amarria não foi realizada.

Os animais em que foram confeccionadas as amarras receberam uma dieta hipercalórica composta por uma associação de 75% da ração convencional acrescida de 20% de banha de porco e 5% de açúcar (Chen, 2014; Zhou, 2011), após a indução cirúrgica e durante 60 dias.

Os demais animais foram alimentados com ração convencional (Labina® - Purina Agribusiness do Brasil Ltda, Paulínia, São Paulo, Brasil), durante todo o experimento.

3.2. Indução da periodontite apical

Após 30 dias da indução da aterosclerose, metade dos animais que sofreram a amarra (10 ratos) e metade dos animais que não sofreram a amarra (10 ratos) foram novamente anestesiados pelo mesmo protocolo descrito anteriormente para indução da periodontite apical.

Foram expostas as polpas dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores direitos de cada animal, empregando-se de uma broca em aço carbono (Broca Long Neck - Maillefer, Dentsply) dotada de uma esfera na extremidade com 0,1mm de diâmetro. Desta forma, todas as exposições pulpares foram padronizadas com 0,1 mm de diâmetro. As polpas ficaram expostas na cavidade bucal por 30 dias, até o final do experimento.

3.3. Divisão em grupos

Após os procedimentos de indução foram formados 4 grupos que podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais de acordo com os procedimentos locais e condições sistêmicas dos animais:

		PERIDONTITE APICAL	
		NÃO	SIM
ATEROSCLEROSE	NÃO	C	PA
	SIM	AT	PA+AT

Os 40 ratos em estudo foram divididos em 4 grupos experimentais, contendo 10 animais cada, assim compostos:

- Grupo C: ratos grupo controle;
- Grupo PA: ratos com periodontite apical;

- Grupo AT: ratos com aterosclerose;
- Grupo PA+AT: ratos com periodontite apical e aterosclerose

3.4. Coleta de sangue para análise do hemograma

Decorridos os 60 dias da indução da aterosclerose, todos os animais foram novamente anestesiados e foi realizada punção cardíaca para coleta do tecido hematológico. Para a quantificação das células sanguíneas, as amostras foram colocadas em tubos contendo heparina e foram, imediatamente, enviadas para a mensuração, por meio do hemograma, dos parâmetros: hemácias, volume globular, hemoglobina, VCM, CHCM, leucócitos, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e Proteína Plasmática Total.

3.5. Eutanásia dos animais

Após coleta de sangue, os animais foram eutanasiados com uma sobredose anestésica com Tiopental Sódico, via intraperitoneal (Thiopentax, Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda – Itapira, Brasil - 240mg/Kg), conforme as Diretrizes da prática da eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013).

3.6. Análise por Hemograma

Para a realização do hemograma, foi utilizado o analisador automático ABX (ABX Micros ABC Vet - Horiba ABX Diagnostics, Montpellier, France). Foram observados os seguintes parâmetros: hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$), volume globular (g/dL), hemoglobina (%), volume corpuscular médio (VCM) (fL), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (%), leucócitos (μL), neutrófilos (μL), linfócitos (μL), monócitos (μL), eosinófilos (μL), basófilos (μL) e proteína plasmática total (PPT) (g/dL). Foi empregado o kit ABX VetPack que é 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. O fluxo dos sistemas hidráulicos do aparelho é garantido pela presença de surfactante não iônico. 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 das hemáceas. Pela adição do agente surfactante, a hemoglobina é libertada. Todo o ferro heme é oxidado e os complexos resultantes são quantificados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 530 nm. 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.

4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa SigmaPlot 12.0TM (Chicago, IL, USA). As variáveis que apresentaram distribuição normal passaram pelo teste ANOVA, enquanto que para comparações múltiplas dos resultados entre os grupos estudados, foi utilizado o teste Tukey. Caso não houve 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. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade for menor 5% ($p < 0,05$).

5. Resultados

As contagens sanguíneas foram realizadas para todos os animais, 60 dias após a indução cirúrgica da aterosclerose. O efeito da aterosclerose foi investigado sobre os parâmetros hematológicos dos animais com periodontite apical, em seguida, comparado com os achados correspondentes dos animais normais. Os resultados da contagem do perfil hematológico completo e a contagem diferencial dos glóbulos brancos são mostrados na tabela 2.

Tabela 2. Média e desvio padrão (DP) dos parâmetros das células sanguíneas dos 4 grupos.

Perfil Hematológico	Grupos							
	C		PA		AT		PA+AT	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6,17 ^a	0,32	5,82 ^a	0,33	6,07 ^a	0,396	6,23 ^a	0,40
Volume Globular (g/dL)	45,1 ^a	1,52	43,38 ^a	1,25	44,1 ^a	1,79	45,33 ^a	2,31
Hemoglobina (%)	14,50 ^a	0,64	13,83 ^a	0,66	14,11 ^a	0,38	14,55 ^a	0,84
VCM (fL)	73,15 ^a	2,19	74,62 ^a	2,67	72,74 ^a	2,85	72,83 ^a	2,81
CHCM (%)	32,15 ^a	0,83	31,88 ^a	1,23	32,03 ^a	1,21	32,16 ^a	0,59
Leucócitos (μL)	8790 ^a	2756,99	8525 ^a	1736,41	6440 ^a	2023,30	8300 ^a	1310,64
Neutrófilos (μL)	2474,9 ^a	990,27	1955,7 ^a	728,21	2282,8 ^a	2541,43	1712 ^a	437,66
Linfócito (μL)	5741,5 ^a	1781,47	6251 ^a	1335,33	5059,9 ^a	1723,13	6443,7 ^a	1484,89
Monócito (μL)	396,3 ^a	294,37	175,3 ^a	174,11	189,9 ^a	79,80	295,1 ^a	133,43
Eosinófilo (μL)	256,8 ^a	270,71	126,3 ^{ab}	93,86	50,5 ^b	64,06	14,6 ^b	30,95
Basófilo (μL)	6,2 ^a	19,60	16 ^a	40,22	0,00 ^a	0,00	0,00 ^a	0,00
Proteína Plasmática Total (g/dL)	6,76 ^a	0,26	6,61 ^a	0,27	6,18 ^b	0,187	6,26 ^b	0,26

Entre as células inflamatórias, uma redução no número de leucócitos e basófilos foi observada nos grupos com aterosclerose (AT e PA+AT), no entanto, não apresentaram diferença significativa quando comparado aos demais grupos ($P>0,05$). Quanto ao valor de neutrófilos, o grupo PA+AT apresentou menor valor, porém sem diferença significativa ($P>0,05$). Observou-se menor quantidade de monócitos nos grupos que apresentavam alterações isoladas ou associadas, quando comparados ao grupo controle ($P<0,05$). Eosinófilos e Proteína Plasmática Total reduziram significativamente nos grupos com aterosclerose com relação ao grupo controle ($P<0,05$).

Além disso, a contagem de linfócitos aumentou nos animais do grupo PA+AT quando comparados aos demais grupos, porém sem diferença estatística ($P>0,05$).

6. Discussão

A aterosclerose é uma doença cardiovascular responsável por alterar o endotélio vascular (Ross, 1999; Libby, 2002; Verma et al., 2002) e enrijecer as paredes arteriais (Lönn et al., 2012). Essa enfermidade causou 17,5 milhões de mortes, representando 31% das mortes em nível global e é considerada a principal causa de mortalidade mundial (Paho/Who, 2016).

Por ser uma doença inflamatória que conduz um aumento sistêmico de mediadores inflamatórios (Tedgui & Mallat, 2006; Weber et al., 2008; Ait-Oufella et al., 2011), torna-se conveniente verificar se a presença desta doença pode atuar na patogênese da periodontite apical.

Conforme estudos anteriores na periodontia, nos quais sugerem uma possível relação entre as doenças periodontais com as doenças cardiovasculares (Bartova, 2014; Yu, 2015), estudos em modelo animal demonstraram o fato de alterações sistêmicas, como a diabetes, exercerem efeitos nos tecidos periapicais, bem como as infecções endodônticas serem responsáveis por modular os efeitos das doenças sistêmicas, de forma bidirecional (Cintra, 2013; Cintra, 2014).

No presente estudo, a aterosclerose foi induzida no início do período experimental, por meio da associação de três métodos, para assegurar que a doença fosse estabelecida de maneira satisfatória. Na artéria carótida foi feita uma amarra (Wang, 2015) intencionando a formação de uma estenose proposital. Foi comprovado por estudos anteriores que essa manobra é capaz de causar uma injúria aguda no vaso sanguíneo, permitindo assim, que ocorra o desencadeamento de um processo inflamatório, levando a disfunção endotelial rápida em um curto período de tempo (Nam, 2009). De acordo com estudos anteriores, a inflamação (Siegel et al., 2013) e o estresse oxidativo (Hort et al., 2011) são os principais causadores da aterosclerose, pois levam a um espessamento da parede arterial devido a deposição de materiais gordurosos, cálcio e compostos fibrosos, que levam ao espessamento da parede arterial (Lu e Daugherty 2014).

Um dia após o procedimento cirúrgico, os ratos receberam por dois dias, uma dose de Vitamina D₃ em alta concentração. A principal função da vitamina D é manter as concentrações de cálcio em nível suficiente para controlar a homeostase e aumentar a eficiência do intestino delgado na absorção de cálcio (Holick, 2006). O objetivo dessa administração foi causar hipercalcemia, pois dessa forma a absorção de cálcio seria

favorecida pelo organismo, causando depósito de cálcio na parede da artéria carótida e possivelmente causar a calcificação dos ateromas.

Segundo estudos epidemiológicos, o consumo de uma dieta rica em lipídeos é um fator de risco para as doenças cardiovasculares, pois o alto teor de gordura sistêmico é capaz de gerar um desequilíbrio metabólico, acarretando no acúmulo de lipídeos nas paredes das artérias, resultante pelo recrutamento de células imunes, elevação da produção de citocinas e por conseguinte ruptura da parede arterial (Zhou, 2011).

A infecção oral foi desencadeada por meio da exposição pulpar de molares de ratos, ocasionando a periodontite apical, provenientes de bactérias da cavidade bucal. Essa exposição teve duração de 30 dias, pois é um período considerável para resultar na formação da periodontite apical e necrose pulpar, como já foi apresentado em estudos prévios (Astolphi, 2013; Cintra et al., 2014).

A análise hematológica é um método utilizado para verificar a associação de infecções bucais com alterações sistêmicas e seus efeitos na saúde e homeostase corporal (Gkrania-Klotsas et al., 2010). O hemograma foi o teste de escolha em nosso estudo para avaliar os parâmetros sanguíneos, por ser considerado um método de diagnóstico útil em constatar a presença de inflamação e infecção (Cintra et al., 2014; Gaddale et al., 2014; Musalaiah et al., 2014), pois o sangue é composto por diferentes tipos de células, sais minerais e proteínas, que pode facilitar o diagnóstico de doenças infecciosas (Gkrania-Klotsas et al., 2010), como a PA (Cintra et al., 2014) e, também a doença periodontal (Gaddale et al., 2014; Musalaiah et al., 2014).

Ao verificar o perfil hematológico para investigar se há relação entre a infecção endodôntica e a aterosclerose, nossos resultados demonstraram algumas alterações sanguíneas nos animais com as doenças isoladas ou em associação, quando comparados ao grupo controle. A prevalência de linfócitos observada no grupo PA+AT pode ser devido a presença da lesão com características de inflamação crônica, como foram detectados resultados semelhantes em outro estudo em ratos com doença periodontal e infecção endodôntica associadas a diabetes mellitus (Cintra et al, 2014).

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), porém, no presente estudo foram observadas alterações discrepantes. Embora a

associação das infecções orais com doenças sistêmicas tenha sido amplamente estudada, por se tratar de um estudo preliminar, futuras investigações são necessárias para confirmar quais as desordens sanguíneas ocorrem quando a periodontite apical está associada com a aterosclerose.

Além disso, as alterações observadas nos parâmetros sanguíneos dão indícios que a periodontite apical e a aterosclerose, quando estão presentes, isoladamente ou em associação, podem acarretar em alteração metabólica, causando efeitos nocivos no organismo. Esses resultados indicam que a associação de uma alteração local e sistêmica pode ocasionar ou agravar um distúrbio metabólico, como visto em ratos em que a periodontite apical e a doença periodontal potencializaram os efeitos nocivos da diabetes (Cintra et al., 2017). Os resultados do estudo exposto fornecem evidências de que as infecções endodônticas não causam apenas alterações locais aos tecidos periapicais, como também são capazes de resultar em alterações sistêmicas.

7. Conclusão

Com base nos resultados do presente estudo, podemos concluir que a periodontite apical quando associada com a aterosclerose interfere no perfil hematológico e pode alterar o metabolismo de ratos Wistar.

8. Referências

1. Ait-Oufella, H et al. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. v.31, n.5, p.969-79. May.2011.
2. Allahverdian S , Pannu PS , Francis GA . Contribution of monocyte-derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation. *Cardiovascular Research*. v.95, n.2, p.165-72. Jul. 2012.
3. Astolphi, RD et al. Periapical Lesions Decrease Insulin Signaling in Rat Skeletal Muscle. *Journal of Endodontics*. v.41, n.8, p.1305-10. Aug.2015.
4. Astolphi, RD et al. Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. *Journal of Endodontics* v.39, n.5, p648-52. May.2013.
5. Bartova, J et al. Periodontitis as a risk factor of atherosclerosis. *J Immunol Res*. v.2014, n.2014, Mar.2014.
6. Bian, Z et al. Regulation of the inflammatory response: enhancing neutrophil infiltration under chronic inflammatory conditions. *Journal of Immunology*. v.188, n.2, p.844-53, Jan. 2012

7. Bragt PC, Bonta IL. Oxidant stress during inflammation: anti-inflammatory effects of antioxidants. *Agents Actions*. v.10, n.6, p.536-9, 1980.
8. Cintra, LT et al. Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats. *Clinical Oral Investigations*. v.17, n.6, p.1595-9, Jul. 2013.
9. Cintra, LT et al. Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. *Journal of Endodontics*. v.40, n.8, p.1139-44. Aug.2014.
10. Cintra, LT et al. Effect of Oral Infections on Serum Creatinine Levels in Diabetic Rats. *International Journal of Diabetes and Clinical Research*.v.1, n.3, p.19-23. May.2013.
11. Cintra, LT et al. Multiple Apical Periodontitis Influences Serum Levels of Cytokines and Nitric Oxide. *Journal of Endodontics*. v.42, n.5, p.747-51. May. 2016.
12. Cintra, LT et al. Apical periodontitis and periodontal disease increase serum IL-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. *Clinical Oral Investigations*. v.18, n.9, p.2123-8, Dec.2014.
13. Cintra, LT et al. Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. *International Endodontic Journal*. v.47, n.3, p.228-37, Mar. 2014.
14. Colic M1, Gazivoda D, Vasilijic S, Vucevic D, Lukic A. Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. v.39, n.9, p.690-6, Oct. 2010.
15. Davies, M. J. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart*. v.83, n.3, p.61-366. 2000.
16. De Moor, RJ et al. Periapical health related to the quality of root canal treatment in a Belgian population. *International Endodontic Journal*. v.33, n.2, p.113-20. Mar.2000.
17. Del Prete G. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy*. v.47, n.5, p.450-5, 1992.
18. Dugas, NN et al. Periapical health and treatment quality assessment of root-filled teeth in two Canadian populations. *International Endodontic Journal*. v.36, n.3, p.181-92. Mar.2003.
19. E. Gkrania-Klotsas, Z. Ye, A.J. Cooper, et al. Differential white blood cell count and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of cross-sectional and prospective studies *PLoS One*, p. e13405, May 2010.
20. Etemadifar, R et al. Relationship between periodontal status and C reactive protein and interleukin-6 levels among atherosclerotic patients in Bandar Abbas, Iran in 2014. *Electron Physician*. v.7, n.1, p.1010-6. Mar.2015.
21. Gaddale, R et al. Changes in cellular and molecular components of peripheral blood in patients with generalized aggressive periodontitis. *J Investig Clin Dent*. 2014.
22. Giaever I, Ward E. Cell adhesion to substrates containing adsorbed or attached IgG. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. V.75, n.3, p.1366-8, 1978
23. Gkrania-Klotsas, E et al. Differential white blood cell count and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of cross-sectional and prospective studies. *PLoS One*. v.5, n.10, 13405. Oct.2010.

24. Gomes, MS1 et al. Apical periodontitis and incident cardiovascular events in the Baltimore Longitudinal Study of Ageing. *International Endodontic Journal*. Apr.2015.
25. Hektoen L. Opsonins and other antibodies. *Science*. v.29, n.737, p.241-8, 1909.
26. Hersh, EM et al. Leukocyte subset analysis and related immunological findings in acquired immunodeficiency disease syndrome (AIDS) and malignancies. *Diagnostic Immunology*. v.1, n.3, p.168-73, 1983.
27. Holick, M.F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *Journal of Clinical Investigation*, 116(8), 2062-2072. 2006
28. Hort, MA et al. Diphenyl diselenide effectively reduces atherosclerotic lesions in LDLr mice by attenuation of oxidative stress and inflammation. *Journal Cardiologyv Pharmacology*.V. 58, n.1, p.91-101, 2011.
29. Husain, K et al. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World Journal of Biological Chemistry*. v.26;6 n.3, p.209-17. Aug.2015.
30. Iwata, H.; Nagai, R. Novel immune signals and atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*. v. 14, n. 5, p. 484-90, Oct. 2012.
31. Kudo, C et al. Analysis of the relationship between periodontal disease and atherosclerosis within a local clinical system: across-sectional observational pilot study. *Odontology*. v.103, n.3, p.314-21. Sep.2015.
32. Le J, Vilcek J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Laboratory Investigation*. v.56, n.3, p.234-48, 1987.
33. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. v.420, p.19-26, Dec.2002.
34. Lönn, M. E.; Dennis, J. M.; Stocker, R. Actions of "antioxidants" in the protection against atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 53, n. 4, p. 863-84, Aug. 2012.
35. López NJ. Periodontal treatment may reduce levels of systemic inflammation markers associated with atherosclerotic profile. *J Evid Based Dent Pract*. v.14, n.2, p.53-5. Jun.2014.
36. Lou-Bonafonte, J. M. et al. Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development. *Molecular Nutrition & Food Research*. v. 56, n. 7, p. 1043-57, Jul. 2012
37. Lu H, Daugherty A. Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol*. V.25, n.2, p.157-158, 2014.
38. Lukic A, Danilovic V, Petrovic R. Comparative immunohistochemical and quantitative analysis of inflammatory cells in symptomatic and asymptomatic chronic periapical lesions. *Vojnosanit Preg*. v.65, p.435-40, 2008.
39. Merriman CR, Pulliam LA, Kampschmidt RF. Effect of leukocytic endogenous mediator on C-reactive protein in rabbits. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. v.149, n.3, p.782-4, 1975.
40. Musalaiah, SV et al. Evaluation of nonsurgical periodontal therapy in chronic periodontitis patients with anemia by estimating hematological parameters and high-sensitivity C-reactive protein levels. *J Pharm Bioallied Sci* 6:S64-S69. 2014.

41. Mylona, E et al. Enterococcus faecalis following a dental procedure in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Journal of Clinical Microbiology*. v.50, n.5, p.1807-9. Feb.2012.
42. Nam, D et al. Partial carotid ligation is a model of acutely induced disturbed flow, leading to rapid endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. V.297, n.4, p.1535-43, Oct 2009.
43. Odagiri, K et al. Longitudinal study on white blood cell count and the incidence of metabolic syndrome. *Intern Med*. v.50, n.21, p.2491-8. 2011.
44. Paho/Who. 2016. Disponível em: < <http://www.paho.org/hq/> >. Acessado
45. Ravnskov, U. The questionable role of saturated and polyunsaturated fatty acids in cardiovascular disease. *Journal of Clinical Epidemiology* , v. 51, n. 6, p. 461-464. Jun. 1998.
46. Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*, v.340, n.2, p.115-126, Jan. 1999.
47. Rupf, S et al. Comparison of profiles of key periodontal pathogens in periodontium and endodontium. *Endod Dent Traumatol*. 2000; 16(6):269-75
48. Samuel, RO et al. Endodontic infections increase leukocyte and lymphocyte levels in the blood. *Clin Oral Investig*. Apr 2018.
49. Scott J The pathogenesis of atherosclerosis and new opportunities for treatment and prevention. *Journal of Neural Transmission. Supplementa*. n.63 p.1-17, 2002.
50. Segura-Egea, JJ et al. Diabetes mellitus, periapical inflammation and endodontic treatment outcome. *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*. v.17, n.2, p.356-61, Mar.2012.
51. Siegel, D et al. Inflammation, atherosclerosis, and psoriasis. *Clin. Rev. Allergy Immunol*. V.44, n.2, p.194-204, 2013.
52. Silva, TA et al. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*. 2007; 86:306-19.
53. Siqueira, JF Jr et al. Periradicular status related to the quality of coronal restorations and root canal fillings in a Brazilian population. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. v.100, n.3, p.369-74. Sep.2005.
54. Tapashetti, RP et al. C-reactive Protein as Predict of Increased Carotid Intima Media Thickness in Patients with Chronic Periodontitis. *Journal of International Oral Health*. v.6, n.4, p.47-52, Jul.2014.
55. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiological Reviews*. v.86, n.2, p.515–581. April 2006.
56. Todaro, GJ et al. Transforming growth factors (TGFs): properties and possible mechanisms of action. *Journal of supramolecular structure and cellular biochemistry*. V.15, n.3, p.287-301, 1981.
57. Van, Es T et al. Attenuated atherosclerosis upon IL-17R signaling disruption in LDLr- deficient mice. *V*.388, n.2, p.261-5. Oct. 2009.

58. Velsko, IM et al. Active invasion of oral tissues by *Porphyromonas gingivalis* in mice casually links periodontitis and atherosclerosis. *Plos One*. V16, n.9, p. 97811, May 2014.
59. Verma, S et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation*. v.106, n.8, p.913-919. Aug.2002.
60. Wang, J et al. Prevention of atherosclerosis by Yindan Xinnaotong capsule combined with swimming in rats. *BMC Complement Altern Med*. V.8, n.5, p. 109, Apr 2015.
61. Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nature Reviews Immunology*. v.8, n.10, p.802–815. Oct.2008.
62. Xiong H, Wei L, Peng B. Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions. *Journal of Endodontics*.v.35, n.2, p.16-20, Feb. 2009.
63. Yu, YH et al. Cardiovascular risks associated with incident and prevalent periodontal disease. *J Clin Periodontol*. V.42, n.1, p.21-8, Jan 2015.
64. Zhang X, Peng B. Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. *Journal of Endodontics*. v.31, p.574 –7, Aug. 2005.
65. Zhou BR, Pan Y, Zhai ZM. Fibrinogen and P-selectin expression in atherosclerosis model of Sprague Dawley rat. *Chin Med J*. V. 124, p.3768-3772, 2011.

9. 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 **"Inter-relação entre a periodontite apical e a aterosclerose. Estudo local e sistêmico em ratos Wistar"**, Processo FOA nº 00358-2016, 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 01 de junho de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 14 de Junho de 2018.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 14 de Junho de 2018.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Interrelationship between apical periodontitis and atherosclerosis. Local and systemic study in Wistar rats"**, Protocol FOA nº 00358-2016, 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 June 01, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: June 14, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 14, 2018.


Profa. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora 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