UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"

JULIA PANTAROTO DE AZEVEDO

Influência da Fibrose Hepática na progressão da Periodontite Apical. Análise histológica e imunoistoquímica para Interleucina-6 em Ratos Wistar

ARAÇATUBA- SP
2020

JULIA PANTAROTO DE AZEVEDO

Influência da Fibrose Hepática na progressão da Periodontite Apical. Análise histológica e imunoistoquímica para Interleucina-6 em Ratos Wistar

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra

ARAÇATUBA- SP
2020

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus

Pela oportunidade de trilhar essa jornada a qual chamamos de vida, repleta de aprendizados e evoluções. Se hoje realizo esse grande sonho, é porque estava tudo nos planos Dele, a quem eu sempre entrego a minha vida e o meu amor.

À minha família

Tudo que sou, tudo que faço, tudo que almejo ser é por vocês. Não há nada mais importante para mim nessa vida do que vocês. Costumo dizer que a maior riqueza que podemos ter nessa vida, é a nossa família! Vocês definitivamente são a minha maior riqueza. Gratidão por todas as palavras de conforto, por serem o meu maior exemplo, por todos os ensinamentos que me tornaram quem eu sou. Vocês são o melhor presente que Deus poderia me dar. Nossa família é meu maior exemplo, minha maior inspiração. Meu eterno amor e gratidão. Gratidão. Gratidão.

À minha mãe

A pessoa que sorriu, sofreu, vibrou e me acalmou em todos os momentos dessa jornada. Obrigada por ser tanto mãe. Por ser minha melhor amiga e confidente, por tantas vezes querer pegar minha dor para você para que eu não mais sentisse, por todas as palavras de encorajamento, por nunca em um segundo sequer, soltar minha mão. Você é e sempre será minha eterna companheira.

Ao meu pai

Por não medir esforços para me ver feliz. Acredite, jamais conseguirei expressar em palavras tamanha gratidão pelo pai que você é para nós. Sinto seu amor em cada gesto, em cada preocupação, desde

o lanchinho no café da manhã até o eu te amo de boa noite, sinto o seu amor por mim. Obrigada pai, meu grande herói.

Ao meu irmão

Meu parceiro e grande amigo. Já escrevi outras vezes que sempre que alguém me pergunta como é ter um irmão eu digo: é a melhor coisa que alguém poderia ter. Obrigada por quando criança cuidar tão bem de mim, deixando até mesmo de sair para brincar com os amigos. Obrigada por na adolescência, me mostrar que eu jamais estava sozinha, e que o que era meu era seu e vice-versa. E hoje, obrigada por ser um dos seres humanos que eu mais amo na vida, por trilhar e planejar comigo coisas grandes que ainda realizaremos juntos. Eu e você para sempre.

Aos meus amigos

Posso dizer que sou uma pessoa extremamente abençoada por ter tantas pessoas incríveis no meu caminho. Qual seria a graça da vida se não tivéssemos com quem compartilhar? Vocês são e fazem a minha alegria. Obrigada por me entenderem quando muitas vezes me ausentei dedicada a faculdade, quando cansada preferia ficar em casa, mas que quando precisava, vocês estavam sempre ali. E continuam presentes, em todos os momentos da minha vida. Eu quero e farei de tudo para ter vocês em todos os momentos da minha vida.

Às minhas companheiras de faculdade

Renata e Juliana, que cresceram durante esses cinco anos junto comigo. Renata minha eterna dupla, de clínicas, dos longos estudos juntas, de risadas e de choros. Além de amiga, ela foi psicóloga e ouvinte. Foi companheira e força. Foi um presente e sorte grande. Juliana, por me mostrar sempre com sua bondade o lado bom e leve das coisas, por demonstrar seu amor em cada detalhe de atenção e

cuidado. Sou eternamente grata por ter vocês para sempre em minha vida.

À equipe da endo

Cris, Pedro, Mike, Mari, Carol, Flávio, Letícia, Lariana, Nat, Fran.

Meu crescimento como ser humano, como ouvinte, como pesquisadora se deve totalmente a vocês. Sou eternamente grata por tudo que aprendi durante meus três anos de Iniciação Científica. Aprendizados que vão além da técnica, além do teórico, são aprendizados que irei levar para a vida. A importância do companheirismo, do trabalho em equipe, do ajudar sem esperar receber em troca. Vocês foram tudo isso. E sempre estarão no meu coração.

Em especial, Cris, obrigada por ser minha mentora. Serei eternamente grata por tudo que fez por mim. Nunca mediu esforços para me ajudar, me ensinar, aconselhar, com seu jeitinho doce e compreensível. Você faz parte do meu crescimento e de quem eu sou. Gratidão eterna e muito amor por você.

Ao meu orientador, Luciano Cintra

Para você, somos como filhos. Para mim, você é como um pai da ciência. Onde sinto o carinho e a preocupação em cada ajuda, em cada conselho, em cada reunião onde as palavras certas sempre tocavam lá no fundo e me faziam refletir por semanas. Com você professor, aprendi a ser melhor. Aprendi sobre esforço, sobre dedicação, sobre foco, sobre união e trabalho em equipe. Aprendi que o que desejamos, com esforço podemos alcançar e ser cada dia melhores.

Aprendi que demonstrações de carinho nem sempre são por meio de abraços e sorrisos, mas sim, por gestos e atenção. Você tem todo meu carinho e toda minha admiração professor, obrigada por me acolher e possibilitar que eu me tornasse uma pessoa melhor. Você fez a diferença

em minha formação, mas principalmente em minha vida. Obrigada por tudo.

Ao professor Juliano Milanezi

Exemplo de ser humano e de professor. Costumamos nos espelhar nas pessoas que mais admiramos, e você é uma dessas pessoas a quem tenho muita admiração. Admiro sua didática, sua gentileza, sua humildade, admiro a forma como trata seus alunos como iguais, nunca medindo esforços para ajudar e acolher em qualquer situação. Professores como você são como presentes na vida dos alunos. Sou muita grata por você ter feito parte da minha formação e deste momento tão especial compondo minha banca.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, e em especial à Faculdade de Odontologia de Araçatuba na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Glauco Issamu Miyahara e do vice-diretor Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem.

À Fundação de amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Iniciação científica em meu último ano de graduação (Processos nº: 2018/26012-9) e ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), pela concessão da minha bolsa de Iniciação Científica (Processo nº:148528/2018-0) e também pelas renovações concedidas.

Aos professores que se dedicam incansavelmente pelo aprendizado de qualidade, nos proporcionando uma formação exemplar, sendo além de professores, mentores e espelhos para nós na vida profissional.

Aos funcionários, que sem eles a faculdade não funcionaria e não estaria de pé. Toda a gratidão a vocês que fazem o trabalho dos bastidores, mas que são de extrema importância tanto para os alunos, como para cada paciente que pela universidade já passou.

Aos meus amigos da turma 62, que fizeram parte dessa trajetória junto comigo. A todos desejo uma vida profissional de muito sucesso, muita saúde e garra para batalhar e alcançar todos seus objetivos. Ninguém passa pela vida de ninguém sem um propósito, e vocês com certeza tem um propósito na minha.

Ao departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora que ofereceu todo o aparato necessário para a execução deste trabalho, com os melhores materiais, laboratórios, biotério, e agradeço também a todos os professores da Endodontia que compõe a equipe da disciplina que mesmo indiretamente influenciaram no decorrer de todo esse processo.

Epígrafe

Folhas caem, ciclos se fecham, capítulos se encerram. Despeça-se do ciclo que se encerra com gratidão por tudo que ele ensinou, abra os braços e o coração para o novo, receba com alegria, esperança e fé, o que vem por aí. A cada manhã, cada semana, mês ou ano que se inicia, a vida nos oferece a oportunidade de escrever um capítulo novo, com as cores, sabores, e personagens que escolhermos. Então, escreva uma história que inspire. Escreva uma história que te excite, te motive, e que te faça sentir orgulho de todo o caminho trilhado, para chegar até aqui.

- Wandy Luz.

AZEVEDO, J. P. **Influência da fibrose hepática na progressão da periodontite apical. Análise histológica e imunoístoquimica para Interleucina-6 em Ratos Wistar.** 2020. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da fibrose hepática (FH) no desenvolvimento da periodontite apical (PA), analisando a interleucina 6 (IL-6). Foram utilizados quarenta ratos Wistar divididos em 4 grupos (n=10): Grupo C - ratos controle; Grupo FH - ratos portadores de FH; Grupo PA - ratos portadores de PA; Grupo FH+PA - ratos portadores de FH e PA. A FH foi induzida quimicamente e cirurgicamente. Foi administrado Tetracloreto de Carbono (CCl_4) na dosagem de 0,2 ml/ 100 g de peso corporal, 2 vezes por semana, via intraperitoneal, e durante todo o experimento (60 dias). Após 30 dias do início da administração da droga, foi realizado procedimento cirúrgico de ligadura do ducto biliar e indução da PA, por meio de exposição pulpar dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores direito. Após mais 30 dias os ratos foram eutanasiados e as maxilas coletadas para análise em microscopia de luz. O tecido hepático foi analisado em coloração de Hematoxilina e Eosina (H.E) e Picrosirius red (PSR) para comprovar a indução da fibrose hepática e, as maxilas, processadas para análise histológica, histométrica e imunoistoquímica para IL-6. Os resultados obtidos foram analisados e comparados por testes estatísticos específicos para cada caso com nível de significância de 5% ($p<0,05$). A FH foi confirmada pela análise histológica do fígado nos grupos FH e PA+FH que apresentaram hepatócitos apoptóticos, desorganização vascular e intensa deposição de fibras colágenas no parênquima hepático formando pontes de fibrose. Quanto à periodontite apical observou-se infiltrado inflamatório moderado no grupo PA e intenso no PA+FH ($P<0,05$). A análise histométrica revelou maior área de reabsorção óssea periapical no grupo PA+FH comparado ao grupo PA ($P<0,05$). O padrão de imunomarcação da citocina IL-6 foi mais elevado nos grupos PA+FH quando comparado ao PA ($P<0,05$). Conclui-se que a FH exacerba o infiltrado inflamatório e a reabsorção óssea da periodontite apical bem como o aumento da IL-6.

Palavras-chave: Periodontite apical. Fibrose hepática. Interleucina 6.

AZEVEDO, J. P. **Influence of hepatic fibrosis on the progression of apical periodontitis. Interleukin-6 analysis in Wistar rats.** 2020. 60 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

The aim of this study was evaluate the effect of Liver Fibrosis (LF) on the development of Apical Periodontitis (AP), analyzing the behavior of interleukin 6 (IL-6). Forty Wistar rats were used, divided into 4 groups (n = 10): Group C - control rats; Group LF - rats bearing LF; Group AP - rats bearing AP; LF + AP group - rats bearing LF and AP. LF was induced chemically and surgically. Carbon tetrachloride (CCl_4) was administered at a dosage of 0.2 ml / 100 g body weight, twice weekly, intraperitoneally, and throughout the experiment (60 days). After 30 days from the beginning of the drug administration, a surgical procedure for ligation of the bile duct was performed, and the AP was induced by pulp exposure of the first and second right and upper molars. After another 30 days, the rats were euthanized and the jaws were collected for analysis under light microscopy. The liver tissue was analyzed in H.E and PSR staining to prove the induction of liver fibrosis and the processed jaws for histological, histometric, and immunohistochemical analysis for IL-6. The results obtained were analyzed and compared by specific statistical tests for each case with a significance level of 5% ($p < 0.05$). FH was confirmed by histological analysis of the liver of the FH and PA + FH groups, which presented necrotic hepatocytes, vascular disorganization, and intense deposition of collagen fibers in the hepatic parenchyma forming fibrosis bridges. As for apical periodontitis, a moderate inflammatory infiltrate was observed in the PA group and intense in the PA + FH ($P < 0.05$). Histometric analysis revealed a greater area of periapical bone resorption in the PA + FH group compared to the PA group ($P < 0.05$). The pattern of immunostaining of the cytokine IL-6 was higher in the PA + FH groups when compared to the PA ($P < 0.05$). It is concluded that FH exacerbates the inflammatory infiltrate and bone resorption of apical periodontitis as well as the increase in IL-6.

Keywords: Apical periodontitis. Liver fibrosis. Interleukin-6.

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Indução cirúrgica da fibrose hepática por meio da ligadura do ducto biliar 33
FIGURA 2 – Exposição da polpa dentária dos molares para a indução da periodontite 34
FIGURA 3 – Linha do tempo período experimental 36
FIGURA 4 – Fígados removidos após a eutanásia dos animais 36
FIGURA 5 – Histologia do lóbulo direito do fígado após 60 dias de experimento em aumentos de 50x (A, B, C, D) e 100x (a, b, c, d) em coloração de H.E. 43
FIGURA 6 – Histologia do lóbulo direito do fígado após 60 dias de experimento em aumentos de 50x (A, B, C, D) e 100x (a, b, c, d) em coloração de PSR.….....44
FIGURA 7 – Imagem histológica da região periapical, 30 dias após a exposição pulpar (coloração em H.E) 45
FIGURA 8 – Imagem representativa da imunomarcação da citocina IL-6 na região periapical dos diferentes grupos.....46

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Divisão dos diferentes grupos experimentais 35
TABELA 2 – Análise da intensidade do infiltrado inflamatório e da perda óssea periapical.....45
TABELA 3 – Escores medianos, intervalos interquartis e valores P da análise imunoístoquimica dos grupos.....46

Lista de quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro A – Escores para o critério intensidade do infiltrado inflamatório.....40

Lista de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

% = Percentagem

µm = Micrômetro

C = Grupo controle

CCl_4 = Tetracloreto de carbono

CHE = Células hepáticas estrelares

Dr = Doutor (a)

et al. = E colaboradores

FH = Fibrose hepática

FH = Fibrose Hepática

g = Gramas

H.E = Hematoxilina e eosina

IL-6 = Interleucina 6

Kg = Kilogramas

LDB = Ligadura do ducto biliar

mm. = Milímetros

n = Número de amostras

NaCl = Cloreto de sódio

Nº = Número

ºC = Grau Celsius

p = Nível de significância

PA = Periodontite apical

Prof. = Professor (a)

PSR = Picrosirius red

PVPI = Iodopovidona

SP = São Paulo

UNESP = Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 24
2 OBJETIVOS.....29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....31
3.1 Animais.....31
3.2 Drogas empregadas.....31
3.3 Indução da fibrose hepática.....31
3.4 Indução da periodontite apical.....33
3.5 Divisão em grupos.....34
3.6 Períodos de observação 35
3.7 Coleta de material para análise.....36
3.7.1 Coleta do fígado.....36
3.7.2 Coleta da maxila.....37
3.8 Processamento histológico.....37
3.8.1 Processamento histológico do fígado.....37
3.8.2 Processamento histológico da maxila.....37
3.9 Forma de análise dos resultados.....39
3.9.1 Análise histológica do fígado.....39
3.9.2 Análise histológica e histométrica das lesões periapicais.....39
3.10 Análise imunoístoquimica 40
3.11 Análise estatística 41
4 RESULTADOS.....43
4.1 Análise histológica do fígado 43
4.2 Análise histológica e histométrica das lesões periapicais.....44
4.3 Análise imunoístoquimica.....46
5 DISCUSSÃO.....48
6 CONCLUSÃO.....51
REFERÊNCIAS.....52
ANEXOS.....59

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A relação entre as infecções bucais e as alterações sistêmicas tem sido cada vez mais explorada nas pesquisas da área médica-odontológica, pois estudos revelam que microrganismos presentes na cavidade bucal podem participar da etiopatogenia de outras doenças pela migração das bactérias para um foco de infecção extrabucal ou pelo estabelecimento de um quadro inflamatório sistêmico crônico, a partir da infecção localizada na boca (CINTRA, 2017). As infecções bucais mais prevalentes são a doença periodontal e a periodontite apical (PA). Sabe-se que as vias biológicas que fazem a ligação entre a doença periodontal crônica e as desordens sistêmicas, são as mesmas que podem ligar a periodontite apical crônica à saúde geral (SILVA et al., 2007).

A PA é uma doença inflamatória causada por micro-organismos que colonizam o sistema de canais radiculares (COLIC et al., 2009). É uma consequência da infecção endodôntica, na qual os canais radiculares infectados agem como uma fonte de micro-organismos de espécies patogênicas variadas, que liberam fatores de virulência no tecido periapical, iniciando e sustentando uma resposta inflamatória com o intuito de conter o avanço da infecção endodôntica. Portanto em resposta à infecção bacteriana, as células e mecanismos humorais de defesa do hospedeiro são acionados, citocinas pró- inflamatórias como a IL-6, IL-17, bem como fator de necrose tumoral (TNF-α), são secretados por diferentes células envolvidas na resposta imune periapical (VIDAL et al., 2016). Essas células e mediadores inflamatórios desempenham um papel importante na patogênese da periodontite apical crônica. Como consequência ocorre a reabsorção óssea e a destruição do ligamento periodontal apical (DE SÁ et al., 2003; NAIR, 2004).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que a presença de vários focos de PA foi capaz de aumentar os níveis de triglicérides (CARDOSO et al., 2018), células inflamatórias (AZUMA et al., 2017a, SAMUEL et. al., 2018), e mediadores pró-inflamatórios, como IL-17, IL-6, TNF-α, IL-23 e óxido nítrico (CINTRA et al., 2016b) no tecido hematológico de ratos. Estes achados sugerem que a presença de múltiplos focos da infecção endodôntica exerce uma influência mais significativa e pode comprometer a homeostase de um organismo.

A prevalência da PA varia entre 24% a 86% em diferentes populações, sendo subdiagnosticada na maioria dos casos, geralmente pela ausência de sintomatologia dolorosa, sendo necessário radiografias que evidenciem a presença de áreas radiolúcidas no periápice radicular (PERSOON; ÖZOK, 2017; PIETIÄINEN et al., 2019).

Para este projeto elegemos a Fibrose Hepática (FH) como a alteração sistêmica objeto de estudo, pois diversas funções vitais são efetuadas pelo fígado, sendo este o maior órgão interno do corpo. Tais funções incluem a produção da bile e de proteínas séricas como os fatores de coagulação, a regulação do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, a detoxificação dos produtos gerados na metabolização do álcool e drogas e a detoxificação da amônia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A FH é uma patologia resultante de uma doença inflamatória crônica no fígado, que é caracterizada pela proliferação de células hepáticas estrelares (CHE) e pela diferenciação em células semelhantes aos miofibroblastos que depositam matriz extracelular e colágeno (FRIEDMAN, 2000). Embora a FH possa ser causada por uma variedade de estímulos, os mecanismos moleculares subjacentes a ela geralmente são muito semelhantes. Após o dano hepático, um programa altamente preparado com mudanças moleculares e celulares é iniciado. Neste programa, ocorre uma intensa interação entre macrófagos, monócitos e as células estreladas hepáticas e, ao final, resulta na ativação das células estrelares e sua diferenciação em miofibroblastos, deposição de matriz extracelular, alterações anatômicas e funcionais consecutivas da integridade do fígado (FRIEDMAN, 2008; TACKE; WEISKIRCHEN, 2012). Se a lesão é sustentada, a inflamação crônica e acumulação de matriz extracelular persistem, levando a uma substituição progressiva do parênquima normal do fígado por tecido cicatricial (GRESSNER; WEISKIRCHEN, 2006).

Para se estudar a FH e sua relação com outras estruturas do corpo são empregados modelos animais. Há duas formas clássicas para a indução da FH em animais; 1) a exposição a um agente hepatotóxico; 2) a cirurgia de ligadura do ducto da bile (KOUNTOURAS, BILLING, SCHEUER, 1984). O tetracloreto de carbono (CCl_4) é um dos agentes hepatotóxicos mais amplamente utilizado para indução experimental de lesão hepática em animais de laboratório (CAO et al., 2017; DE

VACA et al., 2018; FUJII et al., 2010; GITIARA et al., 2017; HAMID et al., 2018). O CCl_4 prejudica diretamente os hepatócitos, alterando a permeabilidade do plasma, o lisossoma e as membranas mitocondriais. Seu metabólito, um tóxico triclorometilo ($CCl3^-$) radical produzido pelo Citocromo P-450 2E1 (CYP2E1) nos hepatócitos, induz a peroxidação lipídica e danos na membrana, causando grave necrose centrolobular (STARKEL; LECLERCQ, 2011).

Outro método de indução, a ligadura do ducto biliar (LDB) é também um modelo experimental clássico para estudar a FH em ratos. A ligadura do ducto estimula a multiplicação de células epiteliais biliares e células ovais, resultando em proliferação de ductos biliares, colestase, inflamação portal, e fibrose (POPOV et al., 2010; TAG et al., 2015). Para aumentar a previsibilidade do sucesso da indução da FH, Sirica e Williams (1992) empregaram a associação dos dois métodos.

Após a lesão hepática, a morte dos hepatócitos ativa os linfócitos, plaquetas e macrófagos, que incluem as células de Kupffer e formam um infiltrado inflamatório que produz TGF-β, IL-1β (interleucina-1β) e PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas), ativando as células estreladas do fígado (FRIEDMAN, 2003). Além disso, várias quimiocinas que são liberadas por populações diversas de células infiltradas modulam a reação inflamatória e contribuem para a progressão da ativação de CHE e do insulto fibrótico (ZIMMERMANN; TACKE, 2011).

A Interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pleomórfica que está presente em processos fisiológicos e patológicos, como a resposta ao trauma, à infecção e ao desenvolvimento e progressão da inflamação (NIBALI et al., 2012). É produzida por tipos diferentes de células, incluindo monócitos, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, células mesangiais, células gliais, condrócitos, osteoblastos, células musculares lisas, células T, células B, granulócitos, mastócitos e certos tumores, e sua produção é regulada positiva ou negativamente por uma variedade de estímulos dependendo do tipo de célula (AKIRA; TAGA; KLSHLMOT, 1993). No fígado, essa citocina age como mediadora da resposta inflamatória aguda (TILG; DIEHL, 2000), ativando as CEH a produzir colágeno (POLI, 2000) e consequentemente o desenvolvimento de fibrose (LIEDTKE et al., 2013).

Nosso grupo de pesquisa realizou uma ampla revisão sistemática, onde foi evidenciado que a presença de IL-6 está relacionada com a patogênese de lesões periapicais (AZUMA et al., 2014), contribui no processo de destruição tecidual

local (CINTRA et al., 2016c; HAN et al., 2003; ZHANG et al., 2016) e está presente em ratos com uma ou múltiplas lesões periapicais (CINTRA et al., 2016b). Quantidades significativas de IL-6 foram liberadas na polpa e nos tecidos periapicais de pacientes com pulpite e periodontite apical, enquanto o tecido pulpar não inflamado demonstrou quantidades insignificantes da citocina (BARKHORDAR; HAYASHI; HUSSAIN, 1999). Além disso, foi observado que lesões sintomáticas são caracterizadas por níveis médios de IL-6 significativamente maiores em comparação com lesões assintomáticas e tecidos pulpares saudáveis (BRAZ-SILVA et al., 2018; JAKOVLJEVIC et al., 2015), assim como, em um estado ativo da doença periapical os níveis da IL-6 se encontram elevados (PRSO et al., 2007). Através desses achados que comprovam a presença e alteração da IL-6 na fibrose hepática e na periodontite apical, acreditamos ser importante investigar a influência dessa doença hepática na marcação da IL-6 na PA.

Desta forma, a proposta geral do presente estudo foi avaliar a influência da Fibrose Hepática no desenvolvimento e progressão da Periodontite Apical em ratos Wistar por meio de análises histológica, histométrica e imunoistoquímica para IL-6.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

- Avaliar a influência da FH no desenvolvimento da PA.

Objetivos específicos:

- Analisar o perfil inflamatório da PA induzida em ratos Wistar portadores ou não de FH, por meio das análises histológica em H.E e imunoistoquímica para IL-6.

- Analisar o perfil reabsortivo da PA induzida em ratos Wistar portadores ou não de FH, por meio da análise histométrica das lesões periapicais.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 40 ratos machos (Rattus albinus, Wistar) com um mês de vida, pesando aproximadamente 100g, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP. Os animais foram mantidos em mini-isoladores (Alesco- Monte Mor, São Paulo, Brasil) com temperatura entre 22 e 24ºC com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas, quatro ratos por gaiola, alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água “ad libitum”, exceto nas primeiras 24 horas após intervenção. Os procedimentos experimentais propostos neste estudo foram aprovados pelo comitê de conduta e ética no uso de animais em experimentação (CEUA- 00430-2018-UNESP).

3.2 Drogas empregadas

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

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

3.3 Indução da fibrose hepática

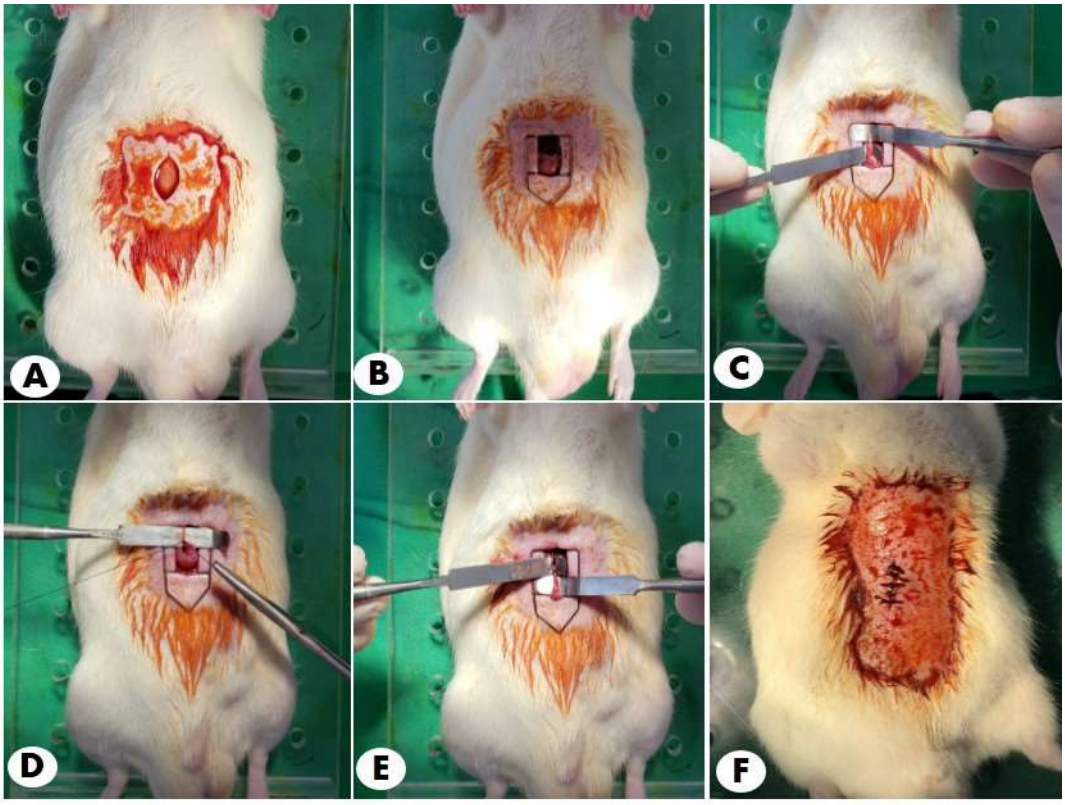
A partir do primeiro dia do experimento (dia 0), 20 animais receberam CCl_4 40% (SIGMA-ALDRICH St. Louis - Missouri, EUA), diluído em óleo de oliva, um

óleo neutro miscível de mistura com o CCl_4 (Naturativa, Fármacia de Manipulação – Araçatuba-SP, Brasil) na dosagem de 0,2 ml/100g do peso corporal duas vezes por semana (BUBNOV et al., 2017; CAO et al., 2017; HAMID et al., 2018), via intraperitoneal, durante 60 dias (dia 60) (ALSAMMAN et al., 2017). Os ratos do grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento recebendo, no entanto, soro fisiológico no mesmo volume e pela mesma via.

Após 30 dias de administração do CCl_4 (dia 30), os animais foram submetidos à cirurgia para LDB de acordo com protocolo já estabelecido (TAG et al., 2015). Inicialmente foram anestesiados via intramuscular, conforme descrito acima. Foi realizada tricotomia e antissepsia com Iodopovidona (PVPI) na região a ser operada e os animais colocados em mesas cirúrgicas para ratos em posição supina. Uma incisão de 2 cm foi realizada na linha média do abdómen.

O tecido conjuntivo foi divulsionado para acesso ao peritônio expondo, em seguida, a cavidade peritoneal por uma incisão, e com um retrator cirúrgico abdominal para animais de pequeno porte desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, a área da operação pôde ser ampliada. Em seguida, o órgão hepático foi hidratado com cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% e levemente levantado com uma espátula nº 24 (GOLGRAN, Indústria e Comércio de Instrumental Odontológico, São Caetano do Sul – SP, Brasil) adaptada. O ducto biliar foi cuidadosamente isolado da veia porta e da artéria hepática usando uma espátula de inserção nº 1 e esculpidor hollemback (GOLGRAN, Indústria e Comércio de Instrumental Odontológico, São Caetano do Sul – SP, Brasil). Em seguida, um fio de sutura não absorvível (Seda, 5-0 - Ethicon Johnson e Johnson, São Paulo – SP, Brasil) foi usado para amarrar o ducto biliar sem provocar cortes. Uma segunda amarria foi realizada para garantir a obstrução efetiva do ducto. Em seguida, o peritônio foi suturado com fio de sutura absorvível (Vicryl, 4-0 - Ethicon Johnson e Johnson, São Paulo – SP, Brasil), em seguida a pele, juntamente com o tecido conjuntivo subcutâneo foram suturados com fio de seda (Seda, 5-0 - Ethicon Johnson e Johnson, São Paulo – SP, Brasil) em pontos interrompidos. Ao final, uma nova assepsia foi realizada com a solução antisséptica utilizada no início do procedimento cirúrgico (Figura 1).

FIGURA 1 – Indução cirúrgica da fibrose hepática por meio da ligadura do ducto biliar



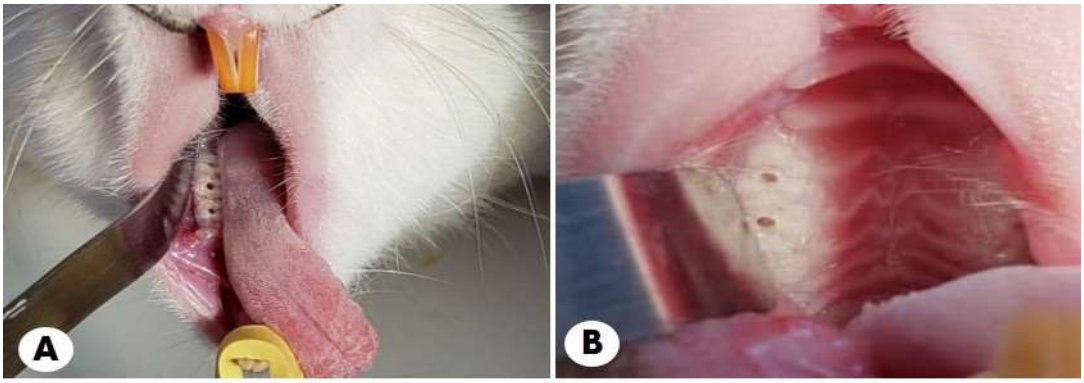
A. Incisão na linha média do abdômen; B. Posicionamento do retrator cirúrgico abdominal; C. Localização do ducto biliar; D. Amarria no ducto; E. Segunda amarria no ducto; F. Aspecto após sutura e antissepsia.

Fonte: Próprio autor, 2018.

3.4 Indução da periodontite apical

A indução das lesões periapicais foram realizadas no mesmo dia da cirurgia para LDB (dia 30). Para indução da PA, as polpas dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores direito de 20 ratos foram expostas, por meio de uma broca em aço carbono (Broca Ln Long Neck- Maillefer, Dentsply) dotada de uma esfera na extremidade com 0,1mm de diâmetro. Assim, todas as exposições pulpares puderam ser padronizadas com 0,1mm de diâmetro (CINTRA *et* al., 2013a) e as polpas ficaram expostas na cavidade bucal por um período de 30 dias até o momento da eutanásia (Figura 2).

FIGURA 2 – Exposição da polpa dentária dos molares para a indução da periodontite



A. Exposição da câmara pulpar no primeiro e segundo molar inferior; B. Exposição da câmara pulpar no primeiro e segundo molar superior.

Fonte: Próprio autor, 2018.

3.5 Divisão em grupos

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, contendo 10 animais em cada grupo, de acordo com a intervenção realizada. O tamanho da amostra foi estimado com base em dados de estudos anteriores (AZUMA et al., 2017a, 2017b). Considerando um erro alfa de 0,05% e um poder de 95% para reconhecer uma diferença significativa de 1 nos escores medianos, foi necessário um mínimo de sete animais por grupo. Considerando possíveis mortes de animais, mais três animais foram adicionados em cada grupo, resultando em dez ratos por grupo (COSME-SILVA et al., 2019). (Tabela 1)

TABELA 1 – Divisão dos diferentes grupos experimentais

Grupos	Descrição
C	Ratos Controle: • Injeção intraperitoneal de soro fisiológico (0,2 ml/100g) • Ratos sem nenhuma patologia induzida.
PA	Ratos com PA: • Indução a lesão periapical durante 4 semanas.
FH	Ratos com FH: • Injeção intraperitoneal de Tetracloreto de Carbono (0,2 ml/100g) duas vezes por semana durante 8 semanas. • Ligadura do ducto da bile após a 4ª semana de injeção de CCl_4 durante 30 dias.
FH+PA	Ratos com FH e PA: • Injeção intraperitoneal de Tetracloreto de Carbono (0,2 ml/100g) duas vezes por semana durante 8 semanas. • Ligadura do ducto da bile após a 4ª semana de injeção de CCl_4 durante 30 dias. • Indução a lesão periapical durante 4 semanas.

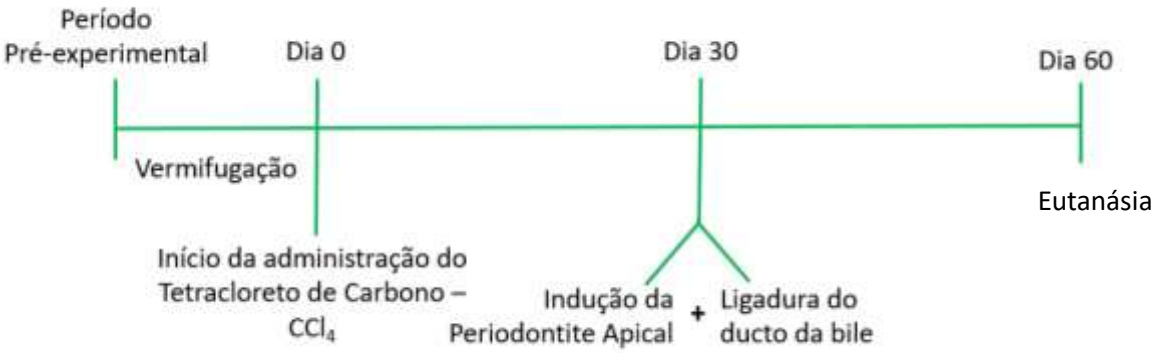
Fonte: Próprio autor, 2019.

3.6 Períodos de observação

Decorrido o período pré-determinado de 8 semanas para a indução do dano hepático, os animais estavam com três meses de vida e pesando em média 400g. Estes foram anestesiados, conforme protocolo descrito anteriormente, e as amostras de cada tecido foram coletadas. Em seguida, os animais foram eutanasiados com 240mg/Kg de Tiopental (CINTRA et al., 2016a).

O “timeline” do experimento pode ser observado abaixo. (Figura 3)

FIGURA 3 – Linha do tempo período experimental



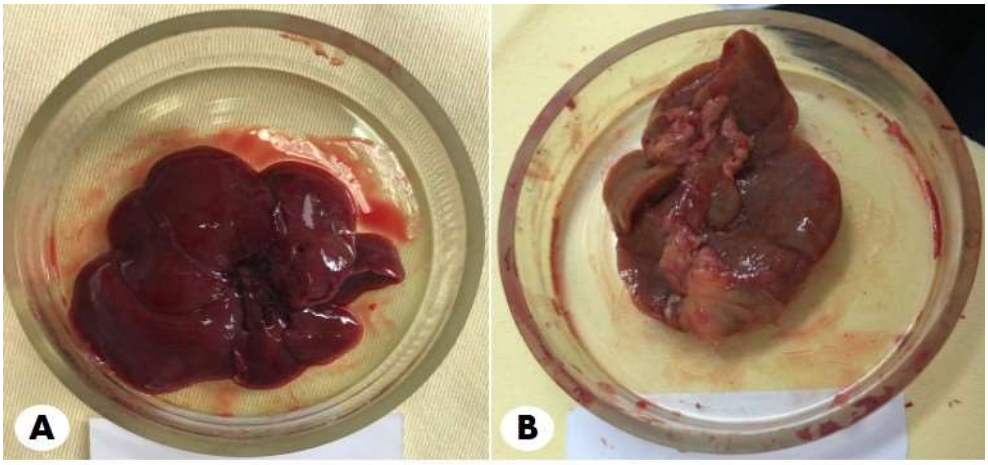
Fonte: Próprio autor, 2018.

3.7 Coleta do material para análise

3.7.1 Coleta do fígado

Para a coleta do fígado foi realizada uma incisão sagital na parte ventral dos animais, onde os órgãos puderam ser visualizados e totalmente removidos (Figura 4). Com o auxílio de uma pinça clínica e de uma tesoura, o fígado foi removido e em seguida, o lóbulo direito separado em cassetes para análise.

FIGURA 4 – Fígados removidos após a eutanásia dos animais



A. Fígado do grupo controle revelando aspecto de normalidade; B. Fígado do grupo fibrose hepática mostrando alteração de cor e forma caracterizando a alteração hepática.
Fonte: Próprio autor, 2018.

3.7.2 Coleta da maxila

Após a eutanásia, toda a pele correspondente à face direita do animal foi removida e foram realizados dois cortes com tesoura, no ângulo da boca, separando a maxila da mandíbula. Foi realizada uma incisão, com lâmina de bisturi intercambiável número 15, em profundidade no palato do animal, com localização no plano sagital mediano acompanhando a sutura intermaxilar, separando a maxila esquerda da direita. Separadas as maxilas, com o auxílio de uma tesoura, foi realizado outro corte com localização tangente a face distal dos molares superiores direito e esquerdo, possibilitando a obtenção da hemimaxila direita, contendo os dentes posteriores, objeto do estudo.

3.8 Processamento histológico

3.8.1 Processamento histológico do fígado

Os lóbulos direitos dos fígados foram fixados em solução formalina a 4%, tamponada com pH neutro, durante as primeiras 22 horas. Em seguida foram lavados em água corrente por um período de 12 horas, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Após inclusão foram realizados cortes teciduais semi-seriados de 5 µm de espessura, em micrótomo específico (Leica - RM 2045). Para cada fígado, 05 lâminas com 3 cortes teciduais foram preparadas e coradas com Hematoxilina e Eosina (H.E) e Picrosirius Red (PSR).

3.8.2 Processamento histológico da maxila

As hemimaxilas direitas foram armazenadas imediatamente em frascos individuais devidamente identificados, contendo solução de formaldeído 4%, tamponada com pH neutro, durante as primeiras 22 horas e depois lavadas em água corrente por um período de 12 horas para a remoção de toda a solução de fixação. Após a lavagem, as peças foram desmineralizadas em solução de EDTA a 10% (SIGMA-ALDRICH St. Louis - Missouri, USA) pelo período de dois meses, realizando trocas da solução duas vezes por semana. Posteriormente, as hemimaxilas foram lavadas em água corrente por 12 horas, desidratadas em álcool, diafanizadas em

xilol e incluídas em parafina. A orientação no momento da inclusão permitiu a realização de cortes teciduais dos segundos molares superiores e estruturas de suporte em seu sentido longitudinal. Após a inclusão, as peças foram cortadas com cortes semi-seriados, com 5 µm de espessura, realizados em micrômetro (Leica- RM 2045). Para cada espécime, 4 lâminas foram separadas, duas coradas em H.E e as demais foram submetidas à técnica de imunoistoquímica, para análise do marcador biológico Anti-IL-6 do rato gerado em coelho (SC-1265, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA).

A técnica da imunoistoquímica empregada foi a imunoperoxidase indireta, onde os cortes histológicos para o imunomarcador proposto (IL-6) foram desparafinizados em xilol e hidratado em etanol. A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão Diva Decloaker® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada Decloaking Chamber® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Ao término de cada uma das etapas da reação imunoistoquímica foram efetuadas lavagens em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4. Os cortes histológicos foram imersos em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e em 1% de soro albumina bovino por 12 horas, para o bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas histológicas foram submetidas à incubação com seu respectivo anticorpo primário diluído em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes foi empregado o Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA). As secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotinilado, durante 2 horas, e posteriormente tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Na revelação foi empregado como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA) e em seguida a contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

3.9 Forma de análise dos resultados

3.9.1 Análise histológica do fígado

A análise histológica dos fígados pela coloração em H.E foi realizada para a confirmação das lesões hepáticas e para caracterizar o tipo de alteração observada: a) inflamação lobular; b) necrose hepatocelular; c) inflamação do trato portal; d) fibrose pericelular, fibrose portal e ponte de fibrose (FRIEDMAN, 2003). A coloração de PSR nos fígados permitiu avaliar a deposição das fibras colágenas que caracterizam a presença da fibrose hepática.

3.9.2 Análise histológica e histométrica das lesões periapicais

Para a análise histológica foram empregadas 2 lâminas com 3 cortes teciduais cada, preparadas e coradas em H.E. A análise histológica serviu para caracterização do perfil inflamatório das lesões periapicais (CINTRA et al., 2014). Os resultados foram expostos por meio de duas análises, sendo uma descritiva e outra qualitativa. As lâminas contendo os cortes representativos de cada espécime foram avaliadas sob a microscopia óptica e utilizadas na análise descritiva. A análise descritiva consistiu da descrição dos fenômenos histopatológicos, procurando caracterizá-los globalmente em função das variáveis experimentais (CINTRA et al., 2014).

A análise qualitativa foi realizada por meio da atribuição de escores, graduando as magnitudes dos fenômenos histopatológicos de forma dissociada e da análise histométrica das estruturas do periodonto apical (CINTRA et al., 2014). As variáveis estudas foram: infiltrado inflamatório quando à sua intensidade e extensão; presença de reabsorções radiculares e perda de estrutura óssea periapical. Foram atribuídos escores para os critérios intensidade e extensão do infiltrado inflamatório e para a presença de reabsorções radiculares. Para a perda de estrutura óssea foi realizada a mensuração linear e por área, respectivamente, empregando programa de imagens específico (Leica QWin Plus - Leica Microsystems, Nussloch – Germany).

Os critérios considerados para cada análise foram:

- Intensidade do infiltrado inflamatório

A intensidade do processo inflamatório foi analisada em conformidade com o número médio aproximado de células inflamatórias presentes em diferentes campos de um mesmo espécime (CINTRA et al., 2013b), examinados em aumento de 400x junto ao periápice dentário (Quadro A).

QUADRO A – Escores para o critério intensidade do infiltrado inflamatório

Escore 1 - Células inflamatórias ausentes ou em número desprezível;
Escore 2 - Infiltrado inflamatório discreto (menos de 10 células por campo);
Escore 3 - Infiltrado inflamatório moderado (entre 10 e 25 células por campo);
Escore 4 - Infiltrado inflamatório intenso (mais que 25 células por campo).

Fonte: Próprio autor, 2019.

- Perda da estrutura óssea

Foram selecionados cortes representativos de cada espécime dos grupos PA e PA+FH focalizando na porção central dos dentes pegando a polpa dentária no seu longo eixo para a verificação se houve diferença na perda óssea de ratos em função da presença da FH. A delimitação da dimensão da lesão se deu por meio da análise do terço apical através do menor aumento. Foi empregado o software Leica QWin Plus (Leica Microsystems, Nussloch – Germany) e os valores expressos em micrometro quadrado (μm^2) obtidos em medidas de área.

3.10 Análise imunoístoquimica

A análise imunoistoquímica foi realizada sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão) por dois investigadores cegos e calibrados. A imunomarcação definida foi aquela de coloração acastanhada presente no citoplasma das células e/ou na matriz extracelular. A análise semiquantitativa, que fornece informações sobre o número de células imunorreativas e a intensidade de imunomarcação da matriz extracelular, foi efetuada utilizando-se 3 secções histológicas para o anticorpo. Os escores do padrão de imunomarcação foram adaptados de Cosme-Silva et al. (2019), onde (escore 0) apresenta ausência total de imunorreação; (escore 1) < 20% das células imunorreativas e fraca marcação da matriz extracelular; (escore 2) >20% e <40% das células imunorreativas e fraca

marcação da matriz extracelular; (escore 3) >40% e <60% das células imunorreativas e moderada marcação da matriz extracelular; (escore 4) >60% e <80% das células imunorreativas e forte marcação da matriz extracelular; (escore 5) >80% das células imunorreativas e forte marcação da matriz extracelular.

3.11 Análise estatística

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

Para os valores quantitativos das análises foi aplicado o teste de Student e para as análises semiquantitativas foi aplicado o testes de Mann-Whitney. O nível de significância considerado foi de 5% ($p<0,05$).

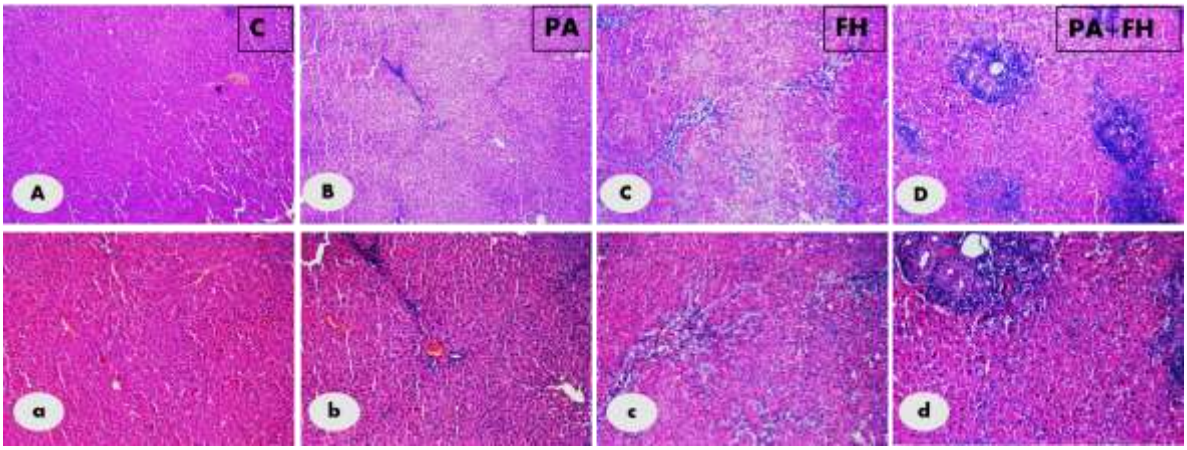
Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise histológica do fígado

Após a eutanásia os fígados foram coletados para análise. Para comprovar a injúria hepática pelo método utilizado foi realizada coloração em H.E, pela qual foi possível observar o tecido hepático normal no grupo C e confirmar a presença de alteração hepática nos grupos FH e PA+FH pela presença de células apoptóticas, alteração vascular em todo o parênquima (Figura 5).

FIGURA 5 – Histologia do lóbulo direito do fígado após 60 dias de experimento em aumentos de 50x (A, B, C, D) e 100x (a, b, c, d) em coloração de H.E

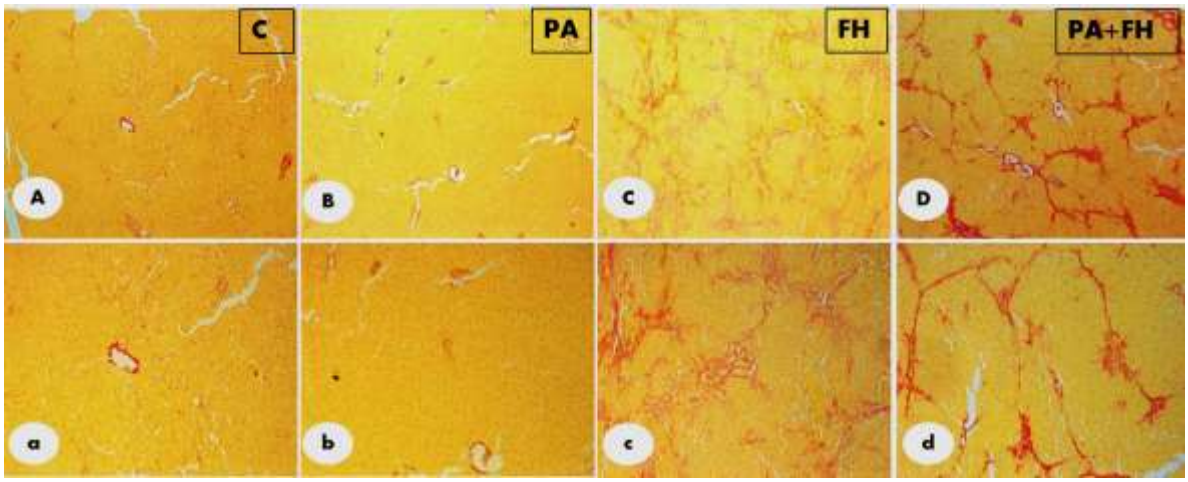


(A, a): Grupo C apresentando organização celular e estrutural do parênquima pela ausência de células necróticas, plexo vascular inalterado e ausência de deposição de fibras colágenas entre os hepatócitos; (B, b): Grupo PA apresentando parênquima organizado, no entanto é possível observar alguns focos de necrose celular sem a deposição de fibras colágenas; (C, c e D, d): Grupo FH e PA+FH respectivamente, apresentando tecido hepático com necrose celular em todo o parênquima, desorganização dos vasos sanguíneos bem como intensa deposição de fibras colágenas em forma de ponte caracterizando a fibrose hepática.

Fonte: Próprio autor, 2019.

Para analisar a deposição de fibras colágenas foi realizada coloração PSR, que revelou ausência de fibrose no parênquima hepático nos grupos C e PA. Os fígados dos grupos FH e PA+FH apresentaram grande deposição de fibras colágenas em todo o parênquima caracterizando a presença de fibrose (Figura 6).

FIGURA 6 – Histologia do lóbulo direito do fígado após 60 dias de experimento em aumentos de 50x (A, B, C, D) e 100x (a, b, c, d) em coloração de PSR



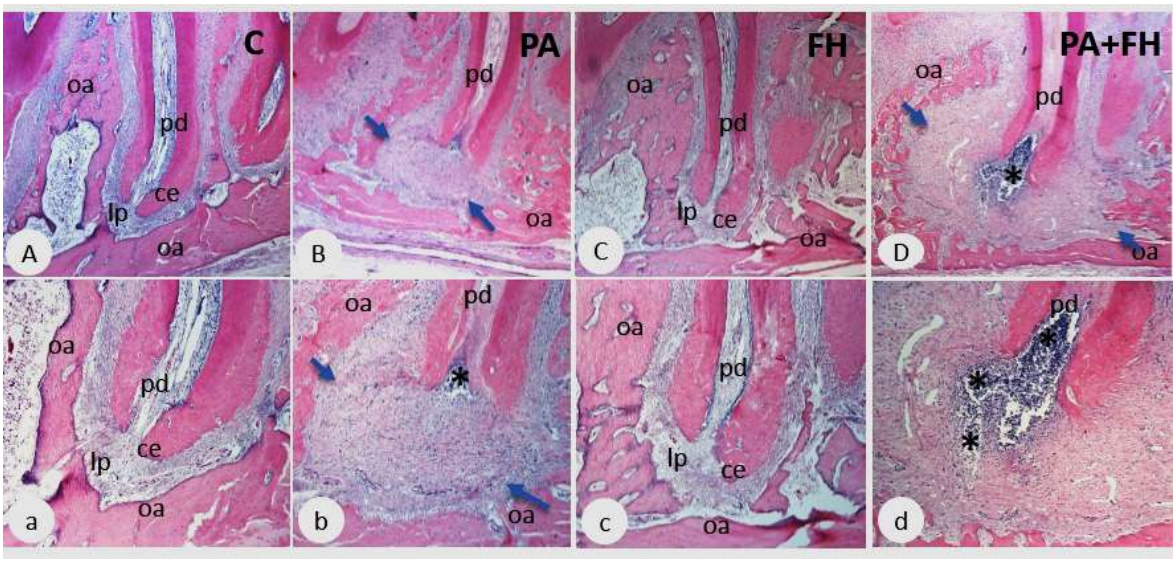
(A, a e B, b) Grupo C e PA respectivamente, apresentando marcação para fibras colágenas somente na parede dos vasos sanguíneos revelando aspectos de normalidade. (C, c e D, d) Grupo FH e PA+FH, apresentando grande deposição de fibras colágenas formando pontes de fibrose e septos no parênquima hepático.

Fonte: Próprio autor, 2019.

4.2 Análise histológica e histométrica das lesões periapicais

Com o intuito de observar os efeitos da fibrose hepática no infiltrado inflamatório da PA foi realizada coloração em H.E e os resultados podem ser observados na tabela 2 e figura 7. Não foi observado sinal de inflamação no tecido pulpar bem como na região periapical dos grupos C e FH (A, a e C, c). Entretanto, nos grupos PA e PA+FH houve necrose total da polpa 30 dias após a exposição ao meio oral, além da presença de periodontite apical comprovando a indução da doença (B, b e D, d). O infiltrado inflamatório foi composto por neutrófilos e células mononucleares, sendo considerado intenso no grupo PA+FH, comparado ao grupo PA que prevaleceu moderado ($p<0,05$). Diferenças estatísticas também foram observadas na análise histométrica da reabsorção óssea periapical, uma vez que o grupo PA+FH teve maior perda óssea em relação ao grupo PA ($p<0,05$).

FIGURA 7 – Imagem histológica da região periapical, 30 dias após a exposição pulpar (coloração em H.E).



A e a): Grupo C apresentando tecido pulpar e região periapical isentos de infiltrado inflamatório (magnificação de 50x e 100x, respectivamente); (B e b): Grupo PA denotando moderado infiltrado inflamatório em torno do ápice, destruição do ligamento periodontal e área de reabsorção óssea (magnificação de 50x e 100x, respectivamente); (C e c): Grupo FH denotando similarmente ao grupo C, tecidos isentos de infiltrado inflamatório (magnificação de 50x e 100x, respectivamente); (D e d): Grupo PA+FH apresentando intenso infiltrado inflamatório, bem como extensa área de reabsorção óssea periapical (magnificação de 50x e 100x, respectivamente). Setas indicam a margem da periodontite apical; pd, polpa dentária; lp, ligamento periodontal; ce, cemento; oa, osso alveolar; *local da inflamação.

Fonte: Próprio autor, 2019.

TABELA 2 – Análise da intensidade do infiltrado inflamatório e da perda óssea periapical

Intensidade do Infiltrado inflamatório	**Grupos experimentais**				**Análise estatística**
	C	**PA**	**FH**	**PA+FH**	
1: ausente	10/10	0/10	10/10	0/10	Teste Mann-Whitney $p < 0.05$
2: médio	0/10	3/10	0/10	0/10	
3: moderado	0/10	4/10	0/10	2/10	
4: intenso	0/10	3/10	0/10	8/10	
Mediana*	1	3[a]	1	4[b]	
Periodontite apical ($x10^4$ µm² ± Desvio padrão*)	13.20 ± 1.67	87.39± 12,77[a]	12.78± 1.71	120,86 ± 25.96[b]	Teste t Student $p < 0.05$

***** Diferentes letras sobrescritas indicam que houve diferença estatística entre os grupos.

Fonte: Próprio autor, 2019.

4.3 Análise imunoístoquimica

Os resultados obtidos na análise imunoistoquímica revelaram níveis aumentados da citocina IL-6 nos grupos PA e PA+FH. O padrão de imunomarcação para a IL-6 no grupo PA+FH foi considerado muito alto comparado ao grupo PA que prevaleceu moderado (p <0,05) (Tabela 3; Figura 8).

TABELA 3 – Escores medianos, intervalos interquartis e valores P da análise imunoistoquímica dos grupos

Escores Medianos e Intervalos Interquartis	Grupos Experimentais				Análise Estatística
Células imunorreativas	**C**	**PA**	**FH**	**PA+FH**	Teste Mann-Whitney
IL-6	1 (1-2)	3 (3-4)[a]	2 (1-2)	5 (4-5)[b]	P = .011

C, controle; PA, periodontite apical; FH, fibrose hepática; IL, interleucina; Letras sobrescritas diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (PA vs PA + FH), P <0,05.

Fonte: Próprio autor, 2019.

FIGURA 8 – Imagem representativa da imunomarcação da citocina IL-6 na região periapical dos diferentes grupos

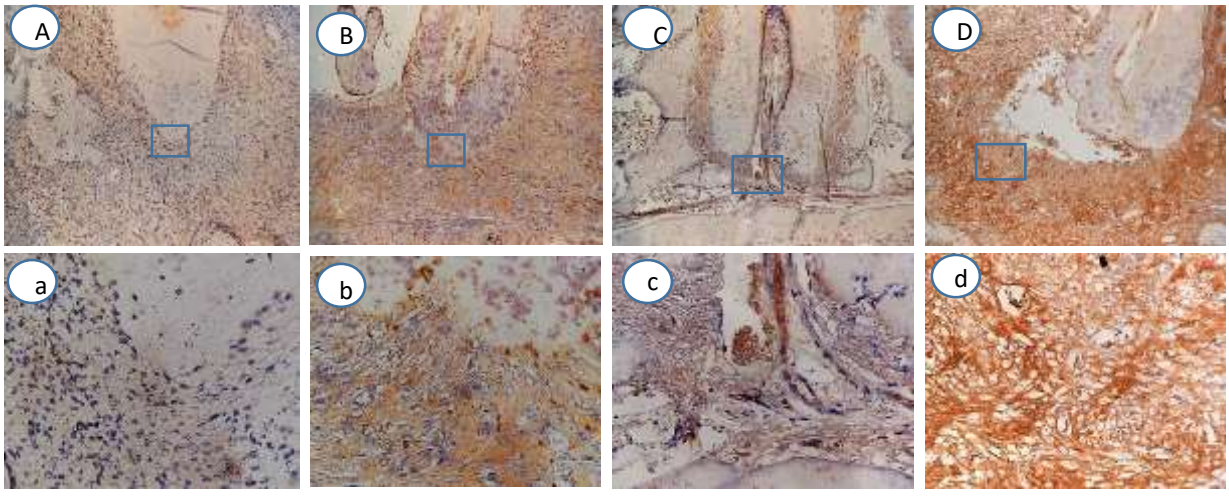


Imagem representativa da imunomarcação da citocina IL-6 na região periapical dos diferentes grupos. Grupos C (A, a); Grupo PA (B, b); Grupo FH (C, c) e Grupo PA+FH (D, d). Observa-se maior imunomarcação celular e da matriz nos grupos PA em relação ao grupo PA+FH (magnificação de 100x e 400x).

Fonte: Próprio autor, 2019.

Discussão

5 DISCUSSÃO

Este estudo analisou a influência da FH no infiltrado inflamatório, na reabsorção óssea periapical e no aumento de citocinas pró-inflamatórias. A intensidade do infiltrado inflamatório foi exacerbada em decorrência da doença hepática, promovendo o aumento da reabsorção óssea periapical e dos níveis de IL-6. Esses resultados corroboram com os achados de outras pesquisas, confirmando que a doença sistêmica pode ser responsável pela piora da periodontite apical. (GRØNKJÆR et al., 2016; KHALIGHINEJAD et al., 2017).

Numerosos estudos consolidam os métodos de indução da PA (CHUANG et al., 2012; SUZUKI et al., 2015; VIRTEJ et al., 2016). Utilizamos neste experimento o modelo previamente padronizado por nosso grupo de pesquisa para analisar a inter-relação das doenças sistêmicas com a periodontite apical (AZUMA et al., 2017a; CINTRA et al., 2014 2017; PRIETO et al., 2017). Por meio de análise histológica pudemos confirmar a periodontite apical, onde os resultados obtidos mostraram áreas de necrose pulpar, reabsorção óssea periapical e infiltrado inflamatório exacerbado nos grupos PA e PA+FH.

Entre os métodos para a indução da FH em ratos, amplamente abordados a décadas, a aplicação de CCl_4 (SIRICA; WILLIAMS, 1992) e cirurgia de LDB estão entre os métodos clássicos (KOUNTOURAS; BILLING; SCHEUER, 1984). O CCl_4 prejudica diretamente os hepatócitos causando grave necrose centrolobular (STARKEL; LECLERCQ, 2011), somado a ligadura do ducto da bile, resultando em proliferação de ductos biliares, colestase, inflamação portal e fibrose (TAG et al., 2015). Quando a lesão é sustentada, o quadro crônico e o acúmulo de matriz extracelular levam a uma substituição progressiva do parênquima hepático normal por tecido cicatricial (GRESSNER, WISKIRCHEN, 2006).

As citocinas pró-inflamatórias modulam o desenvolvimento da FH, levando a ativação das células estrelares hepáticas e a consequente deposição de colágeno responsável pelo desenvolvimento e manutenção da injuria (FRIEDMAN, 2000). A exacerbação da periodontite apical no grupo PA+FH revela que a FH tem potencial de agravar as alterações orais, como observado em estudos anteriores (POYATO-BORREGO et al., 2020; SEGURA-EGEA et al., 2019).

A marcação imunológica de IL-6 apresentou-se exacerbada em animais que apresentaram a fibrose associada à periodontite apical. Esta citocina influencia na resposta inflamatória, estimulando a ativação de osteoclastos, contribuindo para seu aumento sistêmico e reabsorção óssea (CINTRA et al., 2016c). No fígado, essa citocina age como mediadora da resposta inflamatória aguda (TILG; DIEHL, 2000), ativando as CEH a produzir colágeno (POLI, 2000) e consequentemente o desenvolvimento da fibrose (LIEDTKE et al., 2013).

O aumento dos níveis séricos da IL-6 decorrente da injúria hepática, estimula uma resposta pró-inflamatória ao recrutar mais células inflamatórias e mediadores para restringir o processo patológico. Uma vez na corrente sanguínea, a IL-6 pode ser atraída por quimiotaxia para locais com processos inflamatórios incipientes, permitindo a inflamação, podendo causar respostas exageradas que danificam o tecido saudável. (CINTRA, 2016b; RONG et al., 2020). Embora a função da inflamação seja proteger o organismo hospedeiro de agentes patogênicos, a inflamação excessiva leva à perda de especificidade e afeta agressivamente os tecidos de regiões distantes a de origem. (CINTRA, 2017)

Este estudo foi capaz de confirmar que a FH é uma doença sistêmica responsável pela piora da periodontite apical. Além disso, os achados deste estudo são de extrema importância, visto que demonstram que a IL-6 é uma das citocinas que atua no desenvolvimento de lesões periapicais frente a doença hepática e abre caminho para que outros mediadores inflamatórios sejam estudados para uma melhor compreensão dos mecanismos imunológicos responsáveis por exacerbar a reabsorção óssea em pacientes afetados sistemicamente.

Essas análises são essenciais para mudar paradigmas que sugerem que as infecções endodônticas são limitadas a cavidade oral. A pesquisa interdisciplinar deve se tornar cada vez mais o padrão nos campos odontológico e médico, visando um correto diagnóstico e tratamento para os pacientes portadores de periodontite apical e acometidos sistemicamente. Novos estudos são necessários para compreender melhor os mecanismos subjacentes ao quadro da periodontite apical influenciada pela fibrose hepática.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a fibrose hepática influencia no desenvolvimento da periodontite apical quanto ao infiltrado inflamatório bem como na reabsorção óssea periapical. No entanto, mais estudos devem ser desenvolvidos a fim de esclarecer o mecanismo pelo qual esta inter-relação ocorre.

REFERÊNCIAS

Akira S, Taga T, Klshlmot T. Interleukin-6 in Biology and Medicine. Adv Immunol. 1993; 54:10.

Alsamman M, Sterzer V, Meurer SK, Sahin H, Schaeper U, Kuscuoglu D, Scholten D. Endoglin in human liver disease and murine models of liver fibrosis-A protective factor against liver fibrosis. Liver Int. 2018; 38:858-67.

Azuma MM, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Pipa CB, Cardoso CBM, Andrada, AC, Kawai T, Cintra LTA. Omega 3 fatty acids reduce bone resorption while promoting boné generation in rat periapical periodontitis. J Endod. 2017a; 43:970-6.

Azuma MM, Gomes-Filho JE, Prieto AKC, Samuel RO, de Lima VMF, Sumida DH, Ervolino E, Cintra LTA. Diabetes increases interleukin-17 levels in periapical, hepatic, and renal tissues in rats. Arc Oral Biol. 2017b; 83:230-5.

Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezan-Junior E, Cintra LT. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. Int Endod J. 2014; 47:615-21.

Barkhordar RA, Hayashi C, Hussain MZ. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. Endod Dent Traumatol. 1999; 15:26-7.

Braz-Silva PH, Bergamini ML, Mardegan AP, Rosa CS, Hasseus B, Jonasson P. Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: a literature review. Acta Odontol Scand. 2018; 77:173-80.

Bubnov RV, Drahulian MV, Buchek PV, Gulko TP. High regenerative capacity of the liver and irreversible injury of male reproductive system in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis rat model. EPMA J. 2017; 9:59-75.

Cao XF, Jin SZ, Sun L, Zhan YB, Lin F, Li Y, Zhou YL, Wang XM, Gao L, Zhang B. Therapeutic effects of hepatocyte growth factor-overexpressing dental pulp stem cells on liver cirrhosis in a rat model. Sci Rep. 2017; 7:15812.

Cardoso CBM, Azuma MA, Gomes-Filho JE, Pipa CB, Narciso LG, Bomfim SRM, Jacinto RC, Cintra LTA. Omega 3 fatty acids reduce the triglyceride levels in rats with apical periodontitis. Braz Dent J. 2018; 29:173-8.

Chuang FH, Tsai CC, Chen JH, Chen KK, Chen YK, Lin YC. Long-term sequential receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) and osteoprotegrin (OPG) expression in lipopolysaccaride-induced rat periapical lesions. J Oral Path Med. 2012; 41:186-93.

Cintra LT, Facundo ACS, Valentim D, Prieto AKC, Silva CO, Sumida DH, Bomfim SRM, Dezan-Junior E, Gomes-Filho JE. Effectof oral infectionson serum creatinine levels in diabetic rats. Int J Diabet Vasc Dis Res. 2013b; 1:1-6.

Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Queiróz AO, Ervolino E, Sumida DH, Lima VM, Gomes-Filho JE. Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. J Endod. 2016b; 42:747-51.

Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Queiróz AO, Ervolino E, Sumida DH, Lima VM, Gomes-Filho JE. Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. J Endod. 2016c; 42:747-51.

Cintra LT, Samuel RO, Prieto AK, Sumida DH, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Oral health, diabetes, and body weight. Arch Oral Biol. 2016a; 73:94-9.

Cintra LT, Silva Facundo AC, Azuma MM, Sumida DH, Astolphi RD, Bomfim SR, Narciso LG, Gomes-Filho JE. Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats. Clin Oral Investig. 2013a; 17:1595-9.

Cintra LT, Silva Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Narciso LG, Mogami Bomfim SR, Oliveira e Silva C, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. J Endod. 2014; 40:1139-44.

Cintra LTA. Endodontic infection and systemic health. Dental Press Endod. 2017; 7:5-6.

Colić M, Gazivoda D, Vucević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. Mol. Immunol. 2009; 47:101-13.

Cosme-Silva L, Benetti F, Dal-Fabbro R, Gomes Filho JE, Sakai VT, Cintra LTA, Alvarez N, Ervolino E, Viola NV. Biocompatibility and biomineralization ability of Bio-C Pulpecto: a histological and immunohistochemical study. Int J Paediatric Dent 2019; 29:352-60.

De Sá AR, Pimenta FJGS, Dutra WO, Gomez RS. Immunolocalization of interleukin 4, interleukin 6, and lymphotoxin α in dental granulomas. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodo. 2003; 96:356-60.

De Vaca RPC, Domínguez-López M, Guerrero-Celis N, Rodríguez-Aguilera JR, de Sánchez VC. Inflammation is regulated by the adenosine derivative molecule, IFC-305, during reversion of cirrhosis in a CCl_4 rat model. nt Immunopharmacol. 2018; 54:12-23.

Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. Physiol Rev. 2008; 88:125–72.

Friedman SL. Liver fibrosis–from bench to bedside. J Hepatol. 2003;38:38-53.

Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. J Biol Chem. 2000; 275:2247-50.

Fujii T, Fuchs BC, Yamada S, Lauwers GY, Kulu Y, Goodwin JM, Lanuti M, Tanabe KK. Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor. BMC Gastroenterol. 2010; 10:79.

Gitiara A, Tokhanbigli S, Mazhari S, Baghaei K, Hatami B, Hashemi SM, Rad AS, Moradi A, Nasiri M, Ahrabi NZ, Zali MR. Development of experimental fibrotic liver diseases animal model by Carbon Tetracholoride. Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 2017; 10:122.

Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-β as major players and therapeutic Targets. J Cell Mol Med. 2006; 10:76–99.

Grønkjær LL, Holmstrup P, Schou S, Schwartz K, Kongstad J, Jepsen P, Vilstrup H. Presence and consequence of tooth periapical radiolucency in patients with cirrhosis. Hepat Med. 2016; 8:97-103.

Hamid M, Abdulrahim Y, Liu D, Qian G, Khan A, Huang K. The Hepatoprotective Effect of Selenium-Enriched Yeast and Gum Arabic Combination on Carbon Tetrachloride-Induced Chronic Liver Injury in Rats. J Food Sci. 2018; 83:525-34.

Han DC, Huang GTJ, Lin LM, Warner NA, Gim JS, Jewett A. Expression of MHC Class II, CD70, CD80, CD86 and pro-inflammatory cytokines is differentially regulated in oral epithelial cells following bacterial challenge. Oral Microbiol Immunol. 2003; 18:350-8.

Jakovljevic A, Knezevic A, Karalic D, Soldatovic I, Popovic B, Milasin J, Andric M. Pro inflammatory citokyne levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. Aust Endod J. 2015; 41:72-7.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 11th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Khalighinejad N, Aminoshariae A, Kulild JC, Sahly K, Mickel A. Association of end-stage renal disease with radiographically and clinically diagnosed apical periodontitis: a hospital-based study. J Endo. 2017; 43:1438-41.

Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. Br J Exp Pathol. 1984;305–11.

Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, Scholten D, Streetz K, Tacke F, Tolba R, Trautwein C, Trebicka J, Weiskirchen R. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. Fibrogenesis Tissue Repair. 2013; 6:19.

Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. Crit Rev Oral Biol Med. 2004; 15:348-81.

Nibali L, Fedele S, D'Aiuto F, Donos N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. Oral Dis. 2012; 18:236-43.

Persoon IF, Özok AR. Definitions and epidemiology of endodontic infections. Curr Oral Health Rep. 2017; 4:278-85.

Pietiäinen M, Liljestrand JM, Akhi R, Buhlin K, Johansson A, Paju S, Salminen A, Mäntylä P, Sinisalo J, Tjäderhane L, Hörkkö S, Pussinen PJ. Saliva and Serum Immune Responses in Apical Periodontitis. J Clin Med. 2019;8:889.

Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. Mol Aspects Med. 2000; 21:49–98.

Popov Y, Sverdlov DY, Bhaskar KR, Sharma AK, Millonig G, Patsenker E, Krahenbuhl S, Krahenbuhl L, Schuppan D. Macrophage-mediated phagocytosis of apoptotic cholangiocytes contributes to reversal of experimental biliary fibrosis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010; 298:323–34.

Poyato-Borrego M, Segura-Sampedro JJ, Martín-González J, Torres-Domínguez Y, Velasco-Ortega E, Segura-Egea JJ. High prevalence of apical periodontitis in patients with inflammatory bowel disease: an age- and gender- matched case-control study. Inflamm Bowel Dis. 2020; 26:273-9.

Prieto AKC, Gomes-Filho JE, Azuma MM, Sivieri-Araújo G, Narciso LG, Souza JC, Ciarlini PC, Cintra LTA. Influence of apical periodontitis on stress oxidative parameters in diabetic rats. J Endod. 2017; 43:1651-6.

Prso IB, Kocjan W, Simic H, Brumini G, Pezelj-Ribaric S, Borsic J, Ferreri S, Karlovic IM. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. J Ophthalmol. 2007; 38:1-4.

Rong X, Yang Y, Zhang G, Zhang H, Li C, Wang Y. Antler stem cells as a novel stem cell source for reducing liver fibrosis. Cell Tissue Res. 2020; 379:195–206.

Samuel RO, Gomes-Filho JE, Azuma MM, Sumida DH, de Oliveira SHP, Chiba FY, Bomfim SRM, Ciarlini PC, Narciso LG, Cintra LTA. Endodontic infections increase leukocyte and lymphocyte levels in the blood. Clin Oral Investig. 2018; 22:1395-401.

Segura-Egea JJ, Cabanillas-Balsera D, Jiménez-Sánchez MC, Martín-González J. Endodontics and diabetes: association versus causation. Int Endod J. 2019; 52:790-802.

Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. J Dent Res. 2007; 86:306-19.

Sirica AE, Williams TW. Appearance of ductular hepatocytes in rat liver after bile duct ligation and subsequent zone 3 necrosis by carbon tetrachloride. Am J Pathol. 1992; 140:129.

Starkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2011; 25:319–33.

Suzuki N, Takimoto K, Kawashima N. Cathepsin K inhibitor regulates inflammation and bone destruction in experimentally induced rat periapical lesions. J Endod. 2015; 41:1474-9.

Tacke F, Weiskirchen R. Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2012; 6:67–80.

Tag CG, Sauer-Lehnen S, Weiskirchen S, Borkham-Kamphorst E, Tolba RH, Tacke F, Weiskirchen R. Bile duct ligation in mice: induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis. J Vis Exp. 2015; 52438.

Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steahepatitis. N Engl J Med. 2000; 343:1467–6.

Vidal F, Fontes TV, Marques TV, Gonçalves LS. Association between apical periodontitis lesions and plasmatic levels of C-reactive protein, interleukin 6 and fibrinogen in hypertensive patients. Int Endod J. 2016; 49:1107-15.

Virtej A, Papadakou P, Sasaki H, Bletsa A, Berggreen, E. VEGFR-2 reduces while combined VEGFR-2 and-3 signaling increases inflammation in apical periodontitis. J Oral Microl. 2016; 8:32433.

Zhang J, Huang X, Lu B, Zhang C, Cai Z. Can apical periodontitis affect serum levels of CRP, IL-2, and IL-6 as well as induce pathological changes in remote organs? Clin Oral Investig. 2016; 20:1617-24.

Zimmermann HW, Tacke F. Modification of chemokine pathways and immune cell infiltration as a novel therapeutic approach in liver inflammation and fibrosis. Inflamm Allergy Drug Targets. 2011; 10:509–36.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética no uso de animais

unesp **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 fibrose hepática e a periodontite apical"**, Processo FOA nº 00430-2018, 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 14 de Agosto de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 14 de Julho de 2020.
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 14 de Agosto de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Interrelation between liver fibrosis and apical peridodontitis"**, Protocol FOA nº 00430-2018, 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 August 14, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 14, 2020.
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 14, 2020.

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

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