



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

**ARIELI RAYMUNDO VAZÃO**

**Avaliação da composição salivar e estado redox das  
glândulas salivares de ratos Wistar portadores de  
periodontite apical induzida**

**Araçatuba  
2024**

**ARIELI RAYMUNDO VAZÃO**

**Avaliação da composição salivar e estado redox das  
glândulas salivares de ratos Wistar portadores de  
periodontite apical induzida**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho – UNESP”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de concentração em Saúde Bucal da Criança.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Antonio  
Hernandes Chaves Neto

Coorientador: Prof. Assoc. Luciano  
Tavares Ângelo Cintra

**Araçatuba  
2024**

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

V393a Vazão, Arieli Raymundo.  
Avaliação da composição salivar e estado redox das glândulas salivares de ratos Wistar portadores de periodontite apical induzida / Arieli Raymundo Vazão. - Araçatuba, 2024  
63 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientador: Prof. Antonio Hernandes Chaves Neto  
Coorientador: Prof. Luciano Tavares Ângelo Cintra

1. Periodontite periapical 2. Modelos animais 3. Saliva  
4. Glândulas salivares 5. Estresse oxidativo 6. Proteínas e peptídeos salivares I. T.

Black D27  
CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

*Aos meus pais, que são minha base e estão  
presentes em todos os momentos mais importantes  
da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, quem permitiu que eu realizasse este sonho, e vem abençoando e guiando minha jornada durante a graduação e pós-graduação, me dando força em todas as dificuldades, dando sabedoria para superar todos os obstáculos da melhor maneira possível, e colocando pessoas especiais em meu caminho, das quais sou extremamente grata.

Ao **meu orientador Prof. Ass. Dr. Antonio Hernandes Chaves-Neto**, que é minha grande referência e inspiração como pesquisador e professor. Poder conviver com o senhor é um privilégio, agradeço imensamente toda confiança depositada em mim, todas as conversas, incentivo e por sempre me entender perante as dificuldades. A cada dia que passava eu me tornava mais grata por ter o senhor ao meu lado. Não poderia ter um orientador melhor! O senhor sabe exatamente como orientar um aluno! Quem orienta encara de frente o que vier e está sempre pronto a ensinar. Obrigada por tudo, e por ser essa pessoa incrível, que me enche de orgulho e me ensina cada dia mais a fazer o bem ao próximo. O senhor com o seu coração imenso, nos enche de amor e gratidão! Seus ensinamentos ao longo desses anos foram essenciais para a minha formação e o desenvolvimento deste trabalho. Sempre terá minha gratidão.

Ao meu coorientador **Prof. Associado Luciano Tavares Ângelo Cintra** sou grata por todo auxílio na elaboração deste trabalho. Foi uma honra poder contar com o senhor!

As **Prof<sup>as</sup>. Marcelle Danelon e Prof<sup>a</sup>. Gracieli Prado Elias**, agradeço o pronto aceite e disponibilidade em serem banca examinadora deste trabalho, ambas colaborações serão essenciais para engrandecer o trabalho realizado.

A **todo o grupo de pesquisa**, orientado pelo professor Antonio, que me permitiu conhecer pessoas muito talentosas e competentes, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, e de muitos outros que realizamos em todo esse período. Sentirei saudades de todos! Obrigada por sempre serem meu ponto de apoio. Minha família LaBiqS, amo vocês!

A todos **alunos de iniciação científica** do nosso grupo de pesquisa, que tanto auxiliam em nossos trabalhos de pesquisa, sem vocês o desenvolvimento desde trabalho não seria possível. Sempre serei muito grata, em especial a **Lívia Claudino** e **Pedro Penati Pimpinato**, que participaram comigo em todas as etapas deste trabalho.

Ao **meu namorado, João Matheus**, que de todas as oportunidades que a vida me deu, a possibilidade de ter você do meu lado foi a melhor de todas. Poder compartilhar a vida com você é o que me faz mais feliz a cada dia. Você me inspira a ser cada dia melhor, tanto no pessoal, como no profissional. Sem o seu suporte eu não chegaria até onde estou chegando hoje. Te amo, obrigada por estar sempre comigo!

Aos **meus pais**, por toda a base que sempre me deram, o que sempre me motivou a ir mais longe, a vocês minha eterna gratidão. Espero conseguir retribuir tudo que fizeram e ainda fazem por mim. Amo vocês mais que tudo!

A todos os funcionários e professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pelo auxílio prestado ao longo desses anos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 pela bolsa concedida.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo nº 2022/11532-2, pela bolsa concedida ao aluno de iniciação científica deste trabalho, Pedro Penati Pimpinato.

A Pró-Reitoria de Pesquisa da Unesp (PROPe – Unesp – Process nº 2022-5529-4-PIBIC, pela bolsa concedida à aluna de iniciação científica deste trabalho Lívia Claudino.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

*José de Alencar*

VAZÃO, A. R. **Avaliação da composição salivar e estado redox das glândulas salivares de ratos Wistar portadores de periodontite apical induzida**. 2024. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

## RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da periodontite apical experimental nos parâmetros inflamatórios, funcionais, bioquímicos e redox das glândulas parótida e submandibular em ratos. Vinte ratos Wistar machos, com 12 semanas de idade, foram divididos aleatoriamente em dois grupos ( $n = 10$ ): grupo controle, sem lesões induzidas e grupo periodontite apical, com 4 dentes com lesões induzidas. Após 28 dias, a saliva estimulada por pilocarpina foi coletada para análise da taxa de fluxo salivar e composição bioquímica (proteína total, amilase e eletrólitos). As glândulas parótida e submandibular foram coletadas para quantificação do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), capacidade oxidativa total, peroxidação lipídica, expressa como substância reativa ao ácido tiobarbitúrico, proteína carbonila, capacidade antioxidante total, glutathione, superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. As análises estatísticas foram realizadas usando o teste t de Student pareado (esquerda *versus* direita) e o teste t de Student não pareado (controle *versus* periodontite apical),  $p < 0,05$ . As concentrações de TNF- $\alpha$  foram mais elevadas em ambas as glândulas salivares adjacentes às lesões periapicais em animais com periodontite apical ( $p < 0,05$ ), e também em comparação com o grupo controle ( $p < 0,01$ ). Embora a taxa de fluxo salivar, o pH e a capacidade tampão fossem semelhantes entre os grupos, o grupo com periodontite apical aumentou a amilase salivar ( $p < 0,01$ ), cloreto ( $p < 0,05$ ), potássio ( $p < 0,01$ ), cálcio ( $p < 0,01$ ) e fosfato ( $p < 0,05$ ). A capacidade oxidante total aumentou na glândula parótida adjacente às lesões periapicais ( $p < 0,001$ ) no mesmo rato e em comparação com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Em contraste, a peroxidação lipídica e proteica não diferiram entre os grupos em nenhuma das glândulas salivares. Pelo contrário, a capacidade antioxidante total das glândulas parótidas em ambos os lados no grupo com periodontite apical foi menor do que no grupo controle ( $p < 0,05$ ). Além disso, a atividade da glutathione peroxidase aumentou na glândula submandibular adjacente ao grupo com periodontite apical em comparação com o grupo controle ( $p < 0,05$ ), enquanto as atividades de glutathione, superóxido dismutase e catalase não foram alteradas pela periodontite apical. Conclui-se que a periodontite apical

experimental altera a composição bioquímica salivar, além de aumentar os marcadores inflamatórios e induzir distúrbios locais no estado redox nas glândulas parótidas e submandibulares de ratos machos.

**Palavras-chave:** Periodontite apical. Modelo animal. Saliva. Glândulas salivares. Estresse oxidativo. Proteínas salivares.

VAZÃO, A. R. **Assessment of salivary composition and redox status in the salivary glands of Wistar rats with induced apical periodontitis**. 2024. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

## **ABSTRACT**

The objective of the study was to evaluate the effects of experimental apical periodontitis on the inflammatory, functional, biochemical, and redox parameters of the parotid and submandibular glands in rats. Twenty 12-week-old male Wistar rats were randomly divided into two groups ( $n = 10$ ): a control group, without induced lesions and apical periodontitis group, with 4 teeth with induced lesions. After 28 days, pilocarpine-stimulated saliva was collected for salivary flow rate and biochemistry composition analysis (total protein, amylase, and electrolytes). The parotid and submandibular glands were sampled for quantification of the tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), total oxidative capacity, lipid peroxidation, expressed as thiobarbituric acid-reactive substance, carbonyl protein, total antioxidant capacity, glutathione, superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase. Statistical analyses were conducted using the paired Student's t-test (left *versus* right) and unpaired Student's t-test (control *versus* apical periodontitis),  $p < 0.05$ . TNF- $\alpha$  concentrations were higher in both salivary glands adjacent to the periapical lesions in animals with apical periodontitis ( $p < 0.05$ ), and also compared to the control group ( $p < 0.01$ ). Although the salivary flow rate, pH, and buffer capacity were similar between groups, the apical periodontitis group increased the salivary amylase ( $p < 0.01$ ), chloride ( $p < 0.05$ ), potassium ( $p < 0.01$ ), calcium ( $p < 0.01$ ), and phosphate ( $p < 0.05$ ). The total oxidant capacity increased in the parotid gland adjacent to the periapical lesions ( $p < 0.001$ ) in the same rat and compared to the control group ( $p < 0.05$ ). In contrast, lipid and protein peroxidation did not differ between groups in either salivary gland. Conversely, the total antioxidant capacity of the parotid glands on both sides in the apical periodontitis group was lower than the control group ( $p < 0.05$ ). Furthermore, glutathione peroxidase activity increased in the submandibular gland adjacent to the apical periodontitis group compared to the control group ( $p < 0.05$ ), while glutathione, superoxide dismutase, and catalase activities were not altered by apical periodontitis. It is concluded that experimental apical periodontitis alters salivary biochemical composition, in addition to

increasing inflammatory markers and inducing local disturbances in the redox state in the parotid and submandibular glands of male rats.

**Keywords:** Apical periodontitis. Animal model. Saliva. Salivary glands. Oxidative stress. Salivary proteins.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Efeitos da periodontite apical no peso corpóreo, peso e 26  
índice das glândulas salivares, consumo de ração e água e conteúdo  
de proteína total das glândulas salivares

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Evolução histológica da periodontite apical	27
Figura 2 – Efeitos da periodontite apical na concentração de TNF- $\alpha$ nos homogenatos das glândulas parótidas e submandibulares	28
Figura 3 – Efeitos da periodontite apical na disfunção das glândulas salivares em fluxo salivar (A), pH (B), capacidade tamponante (C), proteína total (D), atividade da amilase (E), atividade da amilase normalizada pelo conteúdo de proteína total (F), sódio (G), cloreto (H), potássio (I), cálcio (J) e fosfato (K)	30
Figura 4 – Efeitos da periodontite apical na capacidade oxidante total (A), TBARs (B) e proteína carbonilada (C) nos homogenatos das glândulas parótidas e submandibulares	32
Figura 5 – Efeitos da periodontite apical na capacidade antioxidante total (A) e GSH (B) nos homogenatos das glândulas parótidas e submandibulares	34
Figura 6 – Efeitos da periodontite apical na atividade da SOD (A), CAT (B) e GPx (C) nos homogenatos das glândulas parótidas e submandibulares	36

## LISTA DE SIGLAS

AU	Ácido úrico
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de Ética do Uso de Animais
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DTNB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato)
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GPx	Glutaciona peroxidase salivar
GR	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona reduzida
HE	Hematoxilina-eosina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
PG	Glândulas parótidas
PMSF	Fluoreto de fenilmetanossulfonil
SLG	Glândulas sublinguais
SMG	Glândulas submandibulares
SOD	Superóxido dismutase
TBARs	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 OBJETIVOS .....	17
3 METODOLOGIA.....	18
3.1 Delineamento Experimental .....	18
3.1.1 Animais.....	18
3.1.2 Cálculo amostral.....	19
3.1.3 Indução da periodontite apical.....	19
3.1.4 Coleta da saliva para análises de fluxo salivar, pH e capacidade tamponante	19
3.1.5 Coleta das glândulas salivares.....	20
3.1.6 Coloração com hematoxilina e eosina.....	20
3.2 Parâmetros bioquímicos.....	21
3.3 Análises bioquímicas da saliva.....	21
3.4 Preparação dos homogenatos e análises bioquímicas das glândulas salivares	21
3.4.1 Determinação da concentração de TNF- $\alpha$ .....	22
3.4.2 Determinação da capacidade oxidante total.....	22
3.4.3 Determinação do dano oxidativo aos lipídeos e proteínas .....	23
3.4.4 Determinação da defesa antioxidante não enzimática .....	23
3.4.5 Determinação da defesa antioxidante enzimática .....	23
3.5 Análise estatística .....	24
4 RESULTADOS .....	25
4.1 Efeitos da periodontite apical no peso corpóreo, peso e índice das glândulas salivares, consumo de ração e água e conteúdo de proteína total das glândulas salivares .....	25
4.2 Análise histológica da periodontite apical.....	26
4.3 Análise da concentração de TNF- $\alpha$ no homogenato das glândulas salivares .....	28
4.4 Análise bioquímica da saliva .....	29
4.5 Análises de dano oxidativo.....	31
4.6 Análises da capacidade antioxidante não enzimática .....	33
4.7 Análises da capacidade antioxidante enzimática .....	35
5 DISCUSSÃO .....	38
6 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

ANEXOS .....	59
--------------	----

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças bucais que desencadeiam respostas imune/inflamatória resultam na liberação de uma série de mediadores inflamatórios que podem afetar as glândulas salivares e consequente composição salivar (BAG et al., 2018; PROCTOR; SHAALAN, 2021). Modelos experimentais de doença periodontal em animais demonstraram aumento das concentrações de leucotrienos (BUSCH et al., 2009), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) (EKUNI et al., 2010; SHIKAYAMA et al., 2020), óxido nítrico sintase (BUSCH et al., 2009; MIOZZA et al., 2010) e prostaglandinas (BUSCH et al., 2009; MIOZZA et al., 2009, 2010) nas glândulas salivares de ratos. Tais alterações foram associadas com disfunções das glândulas salivares caracterizadas pelo aumento da secreção de amilase (MIOZZA et al., 2009, 2011), mucinas (BUSCH; STERIN-BORDA; BORDA, 2008) e redução da massa das glândulas salivares (NAKAMURA-KIYAMA et al., 2014). No entanto, ainda não está claro se a periodontite apical poderia ter os mesmos efeitos nas glândulas salivares.

A periodontite apical é um processo inflamatório em torno do ápice de uma raiz, seqüela de uma infecção microbiana do espaço pulpar, pois desenvolve-se tipicamente a partir da exposição da polpa vital a diferentes microbiotas bucais, devido à cárie dentária, trauma acidental ou causas iatrogênicas (SEGURA-EGEA; MARTÍN-GONZÁLEZ; CASTELLANOS-COSANO, 2015; JAKOVLJEVIC et al., 2020). O seu desenvolvimento é regulado pela resposta imune/inflamatória local aguda e/ou crônica do hospedeiro, que está sujeita a influência de doenças metabólicas sistêmicas (SASAKI et al., 2016; CANTIGA-SILVA et al., 2021). Apesar da heterogeneidade de fatores que influenciam no seu diagnóstico e frequência nos pacientes, há o consenso de que sua prevalência é alta e está aumentando na população (JAKOVLJEVIC et al., 2020; TIBÚRCIO-MACHADO et al., 2021a).

O processo inflamatório decorrente da periodontite apical não se limita ao periodonto marginal, uma vez que estudos demonstraram aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias no sangue (GOMES et al., 2013; RASHMI et al., 2017; STYS et al., 2022). Nesse contexto, estudos experimentais com ratos demonstraram que a periodontite apical também aumenta a concentração plasmática do fator de necrose tumoral-alfa (ASTOLPHI et al., 2013), piora dislipidemias (CONTI et al., 2020), reduz a transdução do sinal da insulina e desequilibra o estado redox no

músculo esquelético (ASTOLPHI et al., 2015; TSOSURA et al., 2021; SANTOS et al., 2023), além de aumentar a produção de espécies reativas no coração (BARCELOS et al., 2020; SAMANOVIC et al., 2021) e fígado (XIAO et al., 2023) e reduzir a atividade da catalase no pâncreas (BARCELOS et al., 2020). Apesar das evidências no sangue e em diferentes tecidos, os efeitos da periodontite apical no estado redox das glândulas salivares não são conhecidos.

A saliva é o fluido produzido principalmente pelas glândulas salivares maiores, glândulas parótidas (PG), glândulas submandibulares (SMG) e as glândulas sublinguais (SLG) (YOON et al., 2022). É constituída por 99% de água e o restante por compostos orgânicos como mucinas, imunoglobulinas,  $\alpha$ -amilase, lipídios, além de compostos inorgânicos como cálcio, fósforo, sódio, cloretos e fosfatos, e tem um importante papel na manutenção da saúde bucal, como a eliminação de patógenos, barreira lubrificante, capacidade tampão, manutenção da integridade do dente, reparo de tecido e digestão (MACIEJCZYK et al., 2019; MIRANDA et al., 2023). A produção e secreção de saliva depende do equilíbrio redox nas glândulas salivares, que é assegurado por antioxidantes enzimáticos, por exemplo glutathione peroxidase salivar (GPx), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione redutase (GR), e antioxidantes não-enzimáticos composto pelo ácido úrico (AU), glutathione reduzida (GSH), albumina, lactoferrina e transferrina, ceruloplasmina e polifenóis (ZUKOWSKI et al., 2018; MACIEJCZYK et al., 2019; SKUTNIK-RADZISZEWSKA et al., 2020). Modelos experimentais em animais demonstraram que prejuízos no estado redox são reconhecidos por exercerem função chave nos mecanismos patofisiológicos das disfunções das glândulas salivares decorrentes do diabetes (IBUKI et al., 2020), radioterapia (ÖZGÜR et al., 2019), envelhecimento (BHATTARAI et al., 2018a) e do consumo intenso e episódico do etanol (FAGUNDES et al., 2016). Em algumas situações, maiores concentrações de citocinas inflamatórias ocorrem concomitantemente ao aumento do dano oxidativo, como observado nas disfunções das glândulas salivares induzidas pela radioterapia (TAKAHASHI et al., 2015) e quimioterápico 5-fluorocil (BOMFIN et al., 2017).

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da periodontite apical experimental sobre os parâmetros inflamatórios, funcionais, bioquímicos e redox do glândulas parótidas e submandibulares em ratos.

A hipótese nula postulou que as lesões periapicais não influenciam na função e o estado redox das glândulas salivares.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Delineamento Experimental

#### 3.1.1 Animais

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP, Certificado de Autorização nº 0374-2022 (ANEXO A) e foi conduzido de acordo com as Diretrizes Brasileiras do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Diretiva da UE 2010/63/UE.

Vinte ratos Wistar machos com 12 semanas de idade (*Rattus norvegicus albinus*) foram obtidos no biotério local. Os animais foram alojados em gaiolas coletivas com 2 a 3 animais por gaiola. O ambiente habitacional possuía temperatura controlada de  $21 \pm 3$  °C, ciclo claro/escuro de 12 horas e umidade relativa de  $55 \pm 5\%$ . Durante todo o estudo, os ratos tiveram acesso *ad libitum* a água e ração comercial padrão (Neovia Nutrição e Saúde Animal LTDA, Paulínia, SP, Brasil).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle e grupo com periodontite apical, sendo cada grupo composto por 10 animais ( $n = 10$ ). A periodontite apical foi induzida nos animais quando eles atingiram 12 semanas de idade. No momento da indução da lesão, os animais encontravam-se em bom estado de saúde e não apresentavam alterações sistêmicas. As amostras de saliva, glândulas salivares e maxilares foram coletadas 28 dias após a indução da periodontite apical. Nenhum animal foi excluído do estudo. Durante todo o período experimental, a saúde geral dos animais foi cuidadosamente monitorada pela observação de comportamentos comuns destes animais, entre eles a postura em pé, utilizada para explorar o ambiente (EBISUI; FONTES; LAPCHIK, 2009), e o hábito de limpeza (grooming), pois sua falta indica que o animal está com algum problema (RIVERA, 2009). Também foram realizados monitoramentos da ingestão de água, ração, bem como o peso corporal.

### **3.1.2 Cálculo amostral**

Antes do estudo, o tamanho da amostra foi determinado usando OpenEpi ([//www.openepi.com/Menu/OE\\_Menu.htm](http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm)), com base na concentração de TNF- $\alpha$  nas glândulas parótidas obtida em um estudo piloto. De acordo com o cálculo do poder cinco animais em cada grupo foram suficientes para detectar uma diferença estatisticamente significativa de 4  $\mu\text{g/g}$  na proteína total TNF- $\alpha$  na glândula parótida direita entre os grupos controle e periodontite apical com poder de 80% a um nível de significância de 5%. Para contabilizar possíveis mortes de animais durante a anestesia e coleta de saliva, cinco animais foram adicionados a cada grupo, resultando em um total de 10 ratos por grupo e um tamanho amostral final de 20 animais.

### **3.1.3 Indução da periodontite apical**

Para indução da periodontite apical, os animais foram anestesiados com cetamina (75 mg/kg, IP - Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) e xilazina (10 mg/kg, IP - Coopers, Brasil, Ltda.). Em seguida, as polpas dentárias dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores direitos foram expostas à cavidade oral utilizando uma broca esférica de aço carbono com 0,5 mm de diâmetro (Ln Long Neck-Maillefer Drill, Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) (CINTRA et al., 2016; TSOSURA et al., 2019). A polpa dentária permaneceu exposta ao meio bucal por 28 dias, durante os quais foi possível observar infiltrado inflamatório nas lesões composto por neutrófilos e células mononucleares, ligamento periodontal desorganizado e inflamado e área de reabsorção óssea (CANTIGA-SILVA et al., 2021). Após a indução das lesões, os animais foram monitorados de perto durante o período pós-procedimento até a recuperação completa da anestesia.

### **3.1.4 Coleta da saliva para análises de fluxo salivar, pH e capacidade tamponante**

Após 28 dias da indução da periodontite apical, a saliva foi coletada sob anestesia, após estimulação com 5 mg/kg de nitrato de pilocarpina, denominada "saliva estimulada" (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Para minimizar a influência do ritmo circadiano, a saliva foi coletada sempre no período da manhã (9h00-11h00). Os ratos foram posicionados em um ângulo de 45° com a cabeça posicionada abaixo

do corpo e a saliva foi coletada em béqueres de vidro pré-pesados mantidos em gelo. O tempo de coleta de saliva foi de 10 minutos a partir da primeira gota de saliva (CYPRIANO et al., 2021). O volume foi determinado imediatamente por pesagem, considerando a densidade da saliva como 1 mg/mL (OLIVEIRA et al., 2023). A taxa de fluxo salivar foi expressa em mililitros de saliva por minuto por quilograma de peso corporal. Para prevenir os efeitos dos ciclos de congelamento e descongelamento nas análises bioquímicas, imediatamente após a coleta, a saliva foi dividida em tubos, cada um designado para uma análise bioquímica específica, e armazenada a -80 °C até o processamento. Os volumes das aliquotas de saliva foram suficientes para análise em triplicata dos parâmetros bioquímicos por amostra. Excepcionalmente, a taxa de fluxo salivar, o pH e a capacidade de tamponamento salivar foram analisados imediatamente após a coleta da saliva. O pH salivar foi medido utilizando um eletrodo medidor de pH digital (Thermo Fischer, Orion 720A, MA, EUA). A capacidade tampão salivar foi determinada por meio de titulação, para medir o volume de 0,1 mol/L de ácido láctico necessário para reduzir o pH salivar para 4,0, e expressa em mililitros de ácido láctico por mililitro de saliva (SANTOS et al., 2022).

### **3.1.5 Coleta das glândulas salivares**

Imediatamente após a coleta de saliva, os animais foram eutanasiados por exsanguinação via punção cardíaca. As glândulas parótida e submandibular de ambos os lados foram removidas cirurgicamente, secas externamente com papel filtro e pesadas. As amostras foram então congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para análise do estado redox. O peso relativo das glândulas salivares (relação peso órgão-corpo) foi calculado e representado como um índice (peso da respectiva glândula salivar em grama (g) / peso do animal em quilograma (kg)). O resultado é expresso em g/kg).

### **3.1.6 Coloração com hematoxilina e eosina**

Para confirmar a indução da periodontite apical, as hemi-maxilas e hemi-mandíbulas foram dissecadas e fixadas em formaldeído a 10% em pH neutro por 24 horas e depois lavadas em água corrente por 12 horas para remoção de toda a

solução fixadora. Posteriormente, as hemi-maxilas e hemi-mandíbulas foram desmineralizadas com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10% (p/v) por aproximadamente 90 dias. Os espécimes foram então desidratados em etanol, diafanizados com xilol e embebidos em parafina. Cortes sagitais (5 µm) foram obtidos dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores direitos, utilizando um micrótomo (RM2155, Leica Microsystems, BD, Wetzlar, Alemanha), corados com hematoxilina-eosina (HE) e examinados em microscópio de luz (DM 4000 B; Leica, Wetzlar, Alemanha) quanto à presença de infiltrado inflamatório e reabsorção de tecido ósseo na região periapical (JUSTO et al., 2022).

### **3.2 Parâmetros bioquímicos**

Todos os reagentes utilizados para análises bioquímicas foram provenientes da Sigma-Aldrich (Alemanha/EUA). As medições de absorbância foram realizadas utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (UV-1203, Shimadzu, Japão) e um espectrofotômetro leitor de microplacas (PowerWave 340, BioTek, EUA).

### **3.3 Análises bioquímicas da saliva**

A atividade da amilase foi mensurada utilizando kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil) e expressa em U/dL, normalizada por gramas de proteína total salivar, determinada pelo método Hartree-Lowry (HARTREE, 1972). As concentrações de sódio e potássio foram avaliadas por meio de um analisador de eletrólitos seletivo de íons (modelo 9180, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemanha) e as concentrações de cálcio, fosfato e cloreto foram determinadas por meio de kits colorimétricos comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). Os valores de eletrólitos foram relatados como mmol/L.

### **3.4 Preparação dos homogenatos e análises bioquímicas das glândulas salivares**

As glândulas parótidas e submandibulares direitas e esquerdas dos animais controle e com periodontite apical foram preparadas para as análises bioquímicas.

Estas análises tiveram como objetivo avaliar o impacto local e sistêmico das lesões periapicais no estado redox das glândulas salivares. As amostras foram descongeladas em um recipiente cheio de gelo e depois enxaguadas com solução salina gelada (NaCl 0,9%, p/v). Para preparar homogenatos de glândula a 5%, utilizou-se um homogeneizador Rotor-estator TH (Omni International, Georgia, EUA) em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,4) contendo Triton X-100 a 0,2% (v/v), 10 mmol /L de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) e 2 mmol/L de fluoreto de fenilmetanossulfonil (PMSF). Após homogeneização, os homogenatos foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C utilizando uma centrífuga Eppendorf R 5810 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Para análises bioquímicas, os sobrenadantes foram coletados, divididos em alíquotas e armazenados a -80 °C. As análises foram realizadas em menos de 2 semanas, para evitar a degradação dos componentes. TNF- $\alpha$ , proteína total, capacidade oxidante total, dano oxidativo aos lipídios e proteínas, capacidade antioxidante total, SOD, CAT e GPx foram derivados desses homogenatos. Para análise de GSH, o homogeneizado foi preparado de forma diferente, utilizando ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) contendo 2 mmol/L de EDTA e centrifugado a 1.000 x g por 10 minutos a 4 °C.

#### **3.4.1 Determinação da concentração de TNF- $\alpha$**

A concentração de TNF- $\alpha$  foi quantificada no homogenato das glândulas salivares pela técnica de ELISA com kit DuoSet ELISA (DY510; R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as instruções do fabricante, e normalizada pelo conteúdo de proteína total de cada amostra.

#### **3.4.2 Determinação da capacidade oxidante total**

A capacidade oxidante total foi avaliada pelo método de Erel (EREL, 2005). Neste método, os oxidantes presentes na amostra reagem com o complexo íon ferroso-o-dianisidina, convertendo-o em íon férrico. Em um ambiente ácido, o íon férrico forma um complexo colorido com o xilenol laranja. A intensidade da cor foi medida utilizando um espectrofotômetro no comprimento de onda de 560/800 nm. O

ensaio foi calibrado com peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e os resultados são expressos em termos de  $\text{H}_2\text{O}_2$  micromolar por grama de proteína.

### **3.4.3 Determinação do dano oxidativo aos lipídeos e proteínas**

A peroxidação lipídica foi avaliada medindo a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) (BUEGE; AUST, 1978). A quantificação dos aldeídos presentes nas amostras foi calculada através do coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A concentração de proteínas carbonílicas nas amostras foi quantificada pelo método alcalino com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (MESQUITA et al., 2014). O teor de carbonila foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{450} = 22.308 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### **3.4.4 Determinação da defesa antioxidante não enzimática**

A capacidade antioxidante total foi determinada pelo método espectrofotométrico baseado na redução de ferro (BENZIE; STRAIN, 1996). As concentrações de antioxidantes nas amostras foram calculadas utilizando uma curva padrão gerada com diferentes concentrações de  $\text{FeSO}_4$ . A concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi determinada utilizando 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB) de acordo com o método espectrofotométrico (BEUTLER; DURON; KELLY, 1963) e utilizando o conhecido coeficiente de extinção molar de GSH ( $\epsilon_{412} = 1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Posteriormente, a concentração de GSH foi medida espectrofotometricamente a 412 nm após adequada homogeneização da amostra em vórtex. A concentração de GSH foi normalizada pela concentração total de proteínas.

### **3.4.5 Determinação da defesa antioxidante enzimática**

A atividade da enzima superóxido desmutase (SOD) foi avaliada medindo a taxa de inibição da auto oxidação do pirogalol em tampão Tris-HCl 50 mmol/L (pH 8,2) contendo DTPA 1 mmol/L. O método envolveu medições espectrofotométricas a 420 nm. Uma unidade de atividade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de auto oxidação do pirogalol em 50% (MARKLUND;

MARKLUND, 1974). A atividade da catalase (CAT) foi determinada medindo leituras de absorvância a 240 nm. O ensaio envolveu o monitoramento da taxa de decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L em pH neutro (pH 7,0) (AEBI, 1984). As unidades de atividade enzimática foram calculadas utilizando o coeficiente de extinção molar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\epsilon_{240} = 0,0394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Uma unidade de atividade CAT foi definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto. A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi determinada usando peróxido de di-terc-butila como substrato de reação. Este substrato promoveu a oxidação da GSH pela GPx, resultando na produção de glutathione oxidada. A glutathione oxidada foi então convertida novamente em GSH pela glutathione reductase (GR), consumindo uma molécula de NADPH no processo (WENDEL, 1981). A atividade GPx foi determinada monitorando o consumo de NADPH em meio contendo tampão fosfato de sódio 50 mmol/L (pH 7,5), EDTA 1 mmol/L, NADPH 0,1 mmol/L, azida de sódio 0,4 mmol/L, 0,1 U/mL GR, 1 mmol/L de GSH, 0,5 mmol/L de peróxido de terc-butila e as amostras. As leituras de absorvância foram feitas a 340 nm. Azida de sódio foi incluída no ensaio para inibir a atividade de CAT. Uma unidade de atividade GPx foi definida como a quantidade de enzima que consumiu 1 mmol de NADPH por minuto, com o coeficiente de extinção molar de NADPH em 340 nm ( $\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 3.5 Análise estatística

Todos os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. As comparações estatísticas foram realizadas utilizando o teste *t* de Student não pareado para comparar os grupos controle e periodontite apical, e o teste *t* de Student pareado para comparar as glândulas esquerda e direita. Um nível de significância de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeitos da periodontite apical no peso corpóreo, peso e índice das glândulas salivares, consumo de ração e água e conteúdo de proteína total das glândulas salivares

Todos os animais ganharam peso após o período de 28 dias ( $p < 0,0001$ ), conforme o esperado, porém não houve diferença no peso corpóreo final entre os grupos controle e periodontite apical, e o consumo de ração e água também foram semelhantes (Tabela 1). O peso e o índice da glândula parótida esquerda não apresentaram diferenças significantes entre os grupos. No entanto, o peso da glândula parótida direita ( $p < 0,0001$ ) e o índice ( $p < 0,01$ ) do grupo com periodontite apical foram aumentados em comparação ao controle. Além disso, o peso ( $p < 0,01$ ) e o índice ( $p < 0,01$ ) da glândula parótida direita foram maiores que os do lado esquerdo apenas nos animais do grupo com periodontite apical (Tabela 1). As glândulas submandibulares exibiram valores semelhantes entre os grupos (Tabela 1). A concentração de proteína total tecidual das glândulas parótidas e submandibulares não apresentou diferenças significativas entre os grupos (Tabela 1).

**Tabela 1 – Efeitos da periodontite apical no peso corpóreo, peso e índice das glândulas salivares, consumo de ração e água e conteúdo de proteína total das glândulas salivares)**

<b>Parametros</b>	<b>Controle</b>		<b>Periodontite apical</b>	
Peso corpóreo inicial (g)	448,8 ± 18,02		445,0 ± 21,93	
Peso corpóreo inicial (g)	504,6 ± 27,08 <sup>§§§§</sup>		499,4 ± 27,71 <sup>§§§§</sup>	
Ingestão de ração (g/semana/grupo)	681,0 ± 12,14		642,1 ± 35,58	
Ingestão de água (L/semana/grupo)	1,29 ± 0,03		1,30 ± 0,09	
<b>Glândula parótida</b>	<b>Esquerda</b>	<b>Direita</b>	<b>Esquerda</b>	<b>Direita</b>
Peso (mg)	348,6 ± 42,8	353,2 ± 30,6	384,0 ± 54,4	449,5 ± 44,4 <sup>****##</sup>
Índice (g/kg)	755,6 ± 101,9	738,3 ± 74,8	792,0 ± 115,3	932,4 ± 139,9 <sup>****##</sup>
Proteína total (mg/g de tecido)	20,08 ± 3,85	23,13 ± 2,97	21,71 ± 2,51	23,18 ± 1,83
Peso (mg)	360,4 ± 43,7	363,8 ± 45,7	372,9 ± 30,8	370,1 ± 21,1
Índice (g/kg)	692,6 ± 112,8	688,6 ± 105,9	770,0 ± 94,2	758,6 ± 78,4
Proteína total (mg/g de tecido)	31,60 ± 1,50	31,36 ± 0,96	30,22 ± 1,85	30,90 ± 0,86

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

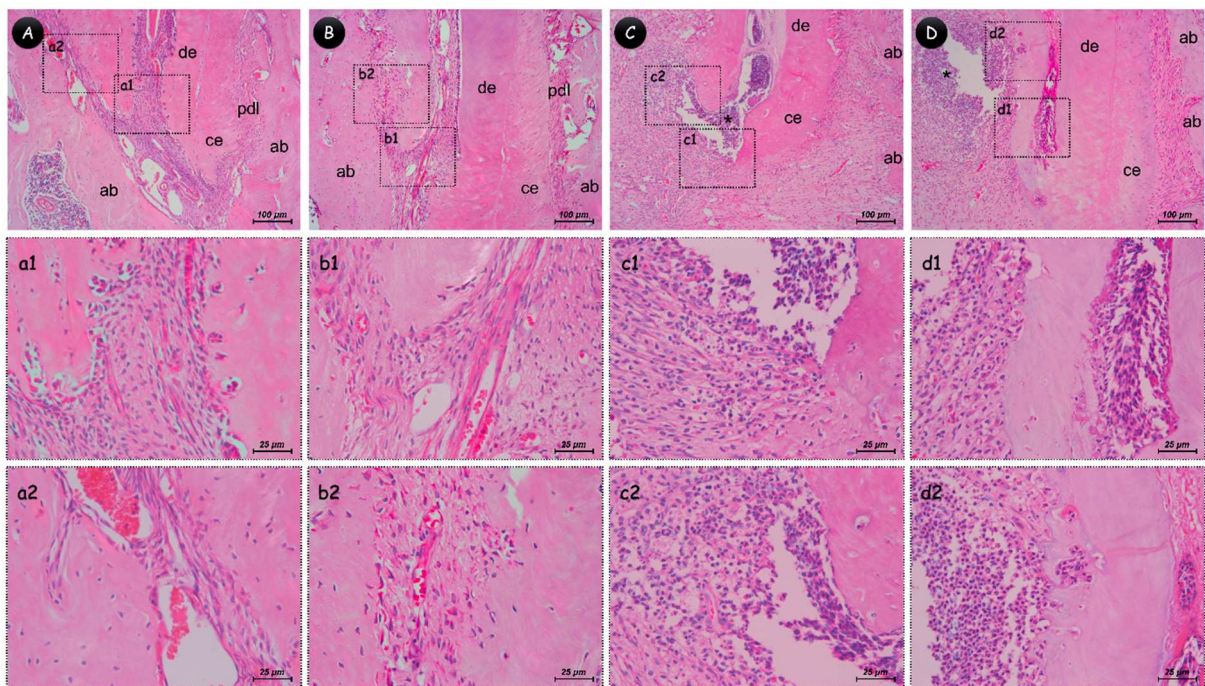
Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=10). A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student não pareado para comparar os grupos Controle e Periodontite Apical, bem como o teste t pareado para comparar as glândulas Esquerda e Direita. Valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos (<sup>\*\*</sup>p < 0,01; <sup>\*\*\*\*</sup>p < 0,0001 versus Controle; <sup>§§§§</sup>p < 0,0001 versus peso corporal inicial; <sup>##</sup>p < 0,01 versus glândula salivar esquerda).

## 4.2 Análise histológica da periodontite apical

A indução da periodontite apical 28 dias após a exposição à polpa dentária foi confirmada pelo exame histológico das hemi-maxilas e hemi-mandíbulas no grupo com periodontite apical. Não foram observados sinais de inflamação pulpar e periapical na maxila (Figura 1A) e mandíbula (Figura 1B) dos grupos controle,

enquanto na maxila (Figura 1C) e mandíbula (Figura 1D) do grupo com periodontite apical, a polpa dentária exibia sinais de necrose total e intensa reabsorção óssea periapical. Além disso, o infiltrado inflamatório das lesões era composto por neutrófilos e células mononucleares.

**Figura 1 – Evolução histológica da periodontite apical**



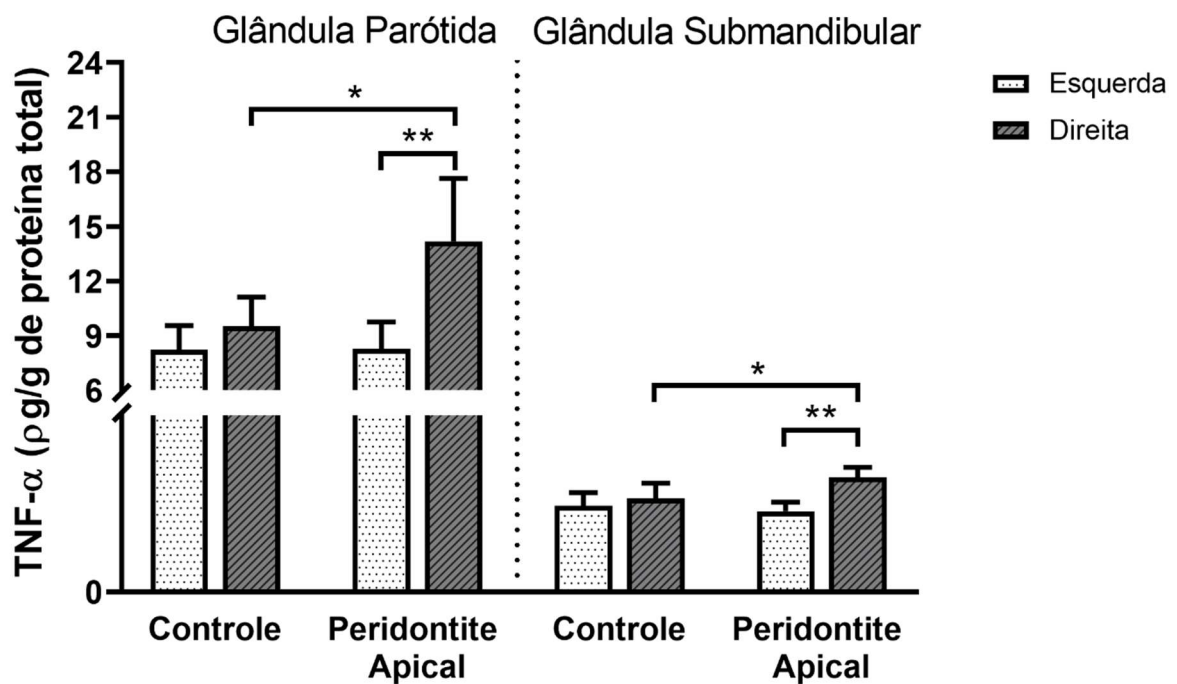
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Imagens representativas da análise histológica da região periapical foram obtidas após 28 dias de exposição pulpar. A coloração HE no grupo Controle para Maxila (A, a1, a2) e Mandíbula (B, b1, b2) demonstrou uma região periapical sem infiltrado inflamatório (a1, b1) bem como canal lateral de raiz (a2, b2). Em contraste, o grupo de periodontite apical na Maxila (C, c1, c2) e Mandíbula (D, d1, d2) mostrou infiltrado inflamatório moderado ao redor do ápice, ruptura do ligamento periodontal e área de reabsorção óssea (c1, d1), juntamente com infiltrado inflamatório moderado ao redor do canal lateral da raiz (c2, d2). Legendas: ab, osso alveolar; ce, cimento; de, dentina; LPD, ligamento periodontal. (coloração HE, ampliação original de  $\times 100$  e  $\times 400$ ).

### 4.3 Análise da concentração de TNF- $\alpha$ no homogenato das glândulas salivares

No grupo com periodontite apical, a concentração de TNF- $\alpha$  foi maior nas glândulas parótida direita ( $p < 0,01$ ) e submandibular direita ( $p < 0,01$ ) em comparação às glândulas salivares esquerdas correspondentes do mesmo animal (Figura 2). Além disso, a periodontite apical levou a um aumento na concentração de TNF- $\alpha$  nas glândulas parótida direita ( $p < 0,05$ ) e submandibular direita ( $p < 0,05$ ) quando comparadas às glândulas direitas dos animais controle (Figura 2).

Figura 2 – Efeitos da periodontite apical na concentração de TNF- nos homogenatos das glândulas parótidas e submandibulares



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

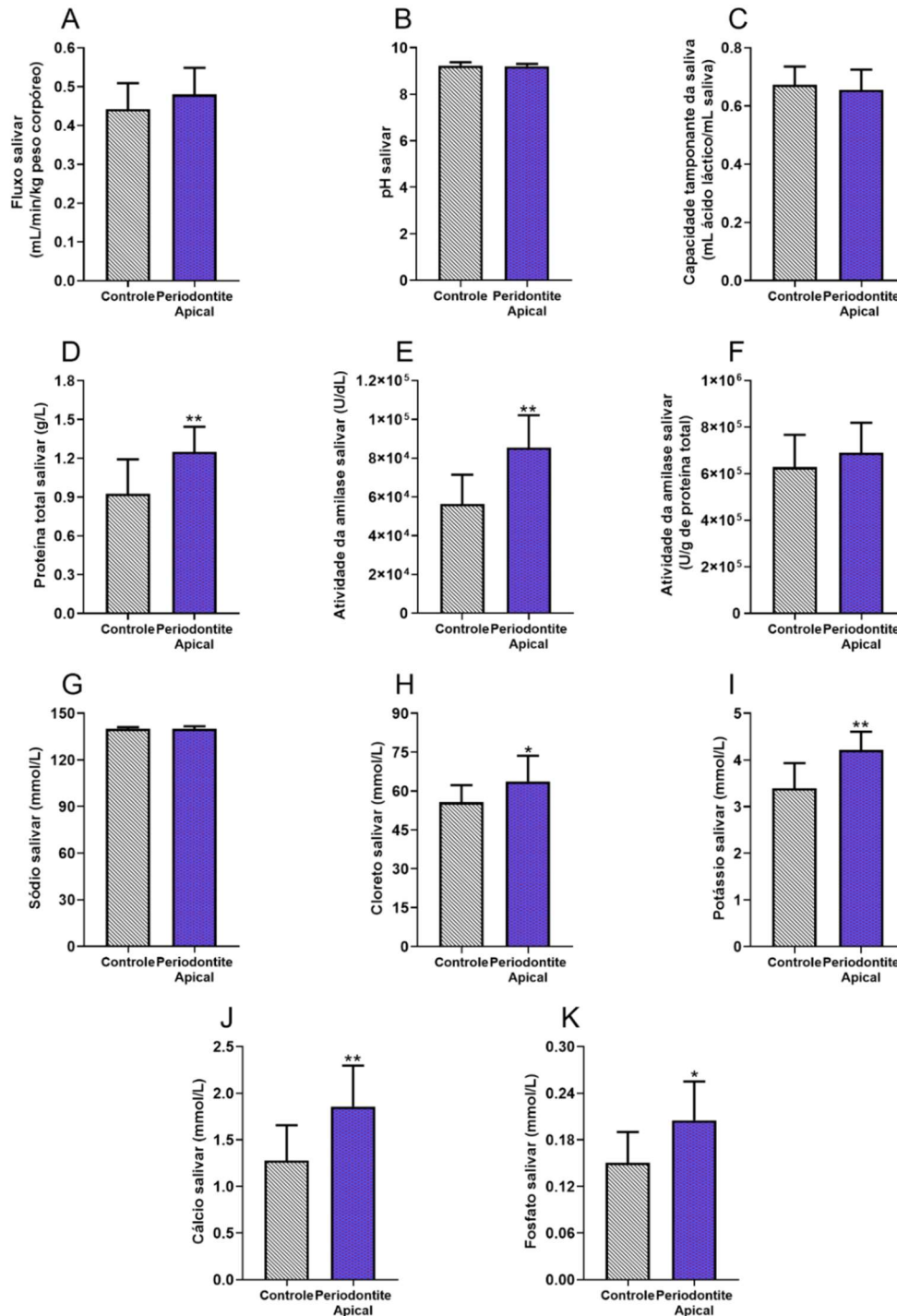
Foram avaliados os efeitos da periodontite apical na concentração de TNF- $\alpha$  nos homogenatos das glândulas parótidas e submandibulares. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, com tamanho amostral de 10 ratos por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando o teste  $t$  de Student não pareado para comparar os grupos Controle e Periodontite Apical, e o teste  $t$  pareado para

comparar as glândulas Esquerda e Direita.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ).

#### **4.4 Análise bioquímica da saliva**

Animais com periodontite apical exibiram taxas de fluxo salivar (Figura 3A), pH (Figura 3B) e capacidade tampão (Figura 3C) semelhantes em comparação ao grupo controle. Entretanto, a periodontite apical resultou em alterações na composição bioquímica salivar. Isso foi caracterizado por um aumento na concentração total de proteínas ( $p < 0,01$ ; Figura 3D) e na atividade da amilase ( $p < 0,01$ ; Figura 3E). Por outro lado, os valores da atividade da amilase normalizada pela proteína foram semelhantes entre os grupos (Figura 3F). Além disso, a periodontite apical induziu aumento da secreção de eletrólitos, como cloreto ( $p < 0,05$ ; Figura 3H), potássio ( $p < 0,01$ ; Figura 3I), cálcio ( $p < 0,01$ ; Figura 3J) e fosfato ( $p < 0,05$ ; Figura 3K), enquanto a concentração de sódio foi semelhante entre os grupos (Figura 3G).

**Figura 3 – Efeitos da periodontite apical na disfunção das glândulas salivares em fluxo salivar (A), pH (B), capacidade tamponante (C), proteína total salivar (D), atividade da amilase (E), atividade da amilase normalizada pelo conteúdo de proteína total (F), sódio (G), cloreto (H), potássio (I), cálcio (J) e fosfato (K)**



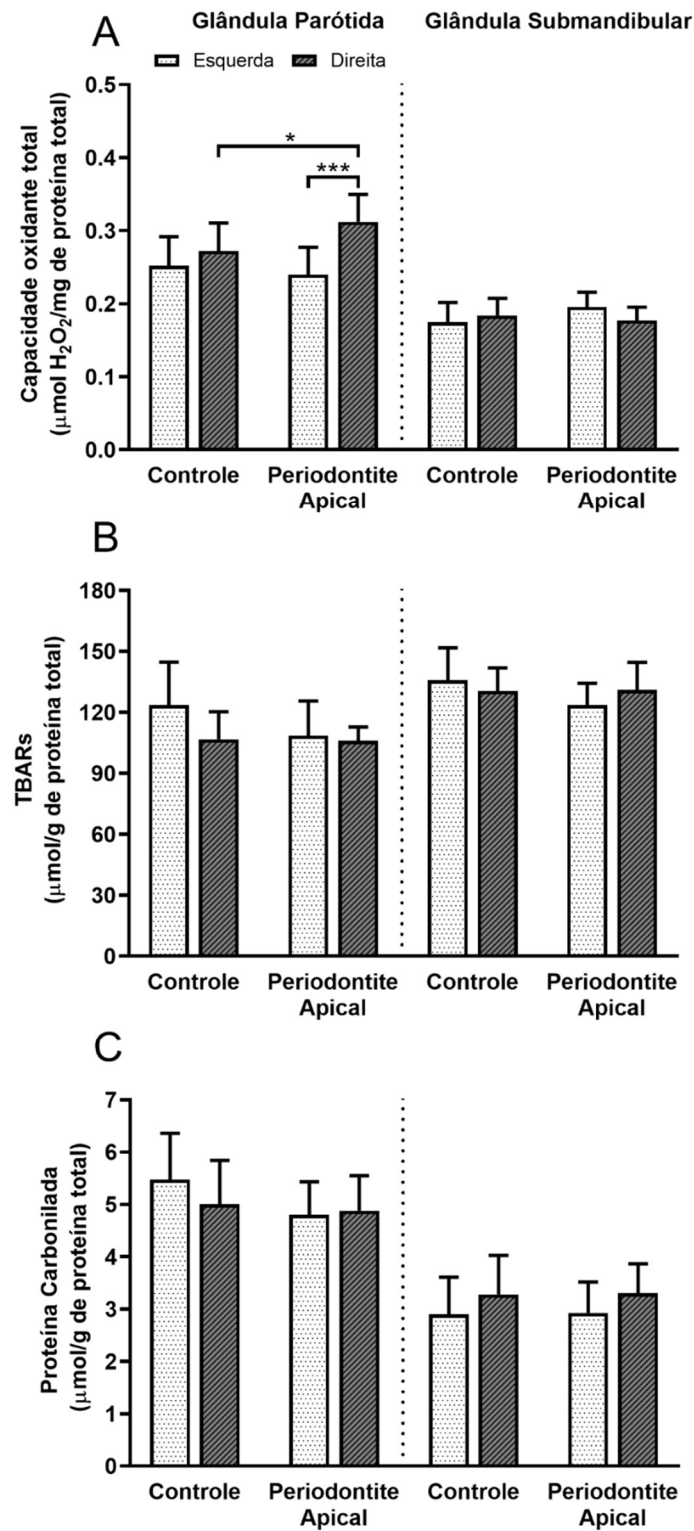
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os efeitos da periodontite apical na disfunção das glândulas salivares foram avaliados na taxa de fluxo salivar (A), pH (B), capacidade tampão salivar (C), proteína total (D), atividade de amilase (E), atividade de amilase normalizada pelo conteúdo de proteína total (F), sódio (G), cloreto (H), potássio (I), cálcio (J) e fosfato (K). Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, com tamanho amostral de 10 ratos por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student não pareado para comparar os grupos Controle e Periodontite Apical.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ).

#### **4.5 Análises de dano oxidativo**

A periodontite apical resultou em aumento da capacidade oxidante na glândula parótida direita em comparação com a glândula esquerda correspondente do mesmo animal ( $p < 0,001$ ; Figura 4A), bem como em comparação com a glândula direita do grupo controle ( $p < 0,05$ ; Figura 4A). Porém, não houve diferenças significativas na capacidade oxidante total da glândula submandibular entre os grupos (Figura 4A). Por outro lado, o dano oxidativo lipídico (Figura 4B) e o dano oxidativo proteico (Figura 4C) nas glândulas parótida e submandibular, medidos por TBARs e concentrações de proteína carbonila, respectivamente, não mostraram diferenças entre os grupos.

Figura 4 – Efeitos da periodontite apical na capacidade oxidante total (A), TBARs (B) e proteína carbonilada (C) nos homogenatos das glândulas parótidas e submandibulares



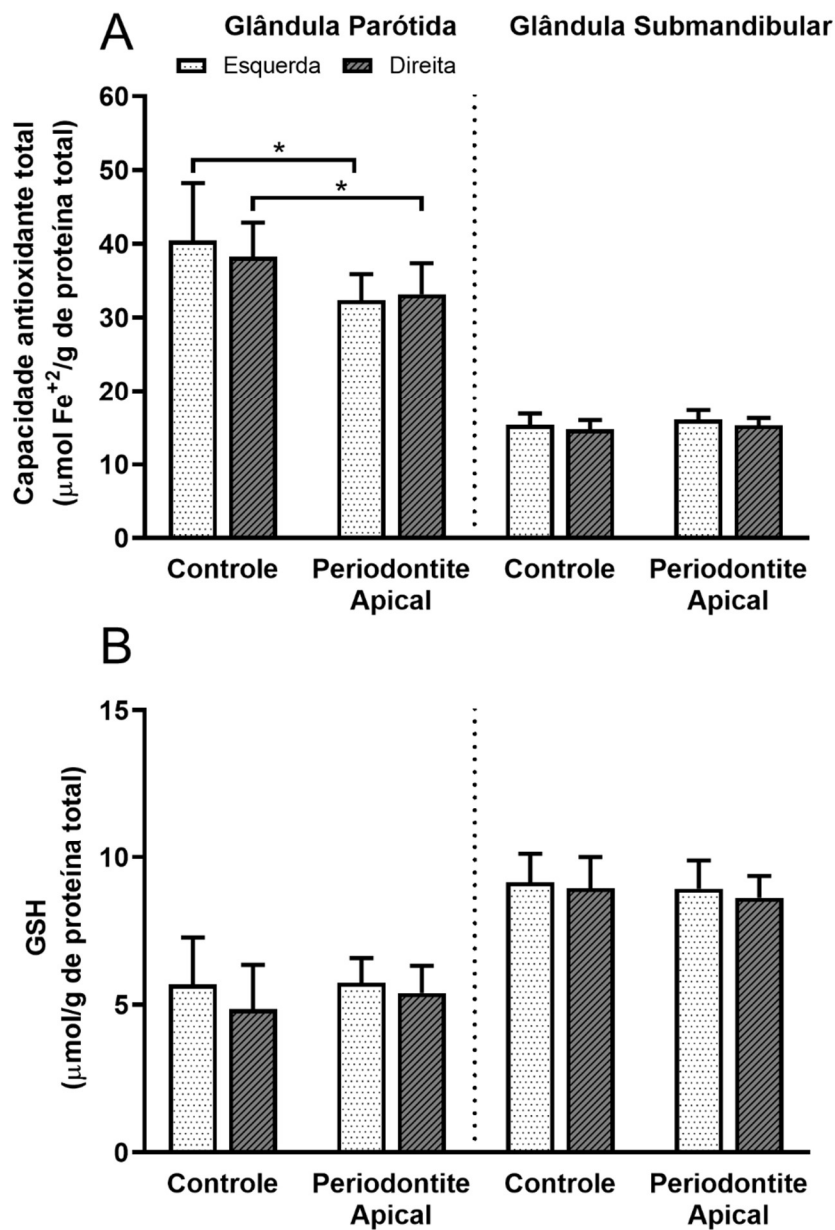
Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os efeitos da periodontite apical na capacidade oxidante total (A), TBARs (B) e proteína carbonilada (C) nos homogenatos das glândulas parótidas e submandibulares foram examinados. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, com tamanho amostral de 10 ratos por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student não pareado para comparar os grupos Controle e Periodontite Apical, bem como o teste t pareado para comparar as glândulas Esquerda e Direita.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo ( $*p < 0,05$ ;  $***p < 0,001$ ).

#### **4.6 Análises da capacidade antioxidante não enzimática**

Embora a capacidade antioxidante total das glândulas parótidas esquerda e direita no grupo com periodontite apical tenha apresentado resultados semelhantes, esses valores foram menores em comparação com as respectivas glândulas do mesmo lado no grupo controle ( $p < 0,5$ ; Figura 5A). Porém, não houve alterações significativas na capacidade antioxidante total das glândulas submandibulares entre os grupos (Figura 5A). A concentração de GSH permaneceu inalterada nas glândulas parótidas e submandibulares devido à periodontite apical (Figura 5B).

Figura 5 – Efeitos da periodontite apical na capacidade antioxidante total (A) e GSH (B) nos homogenatos das glândulas parótidas e submandibulares



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

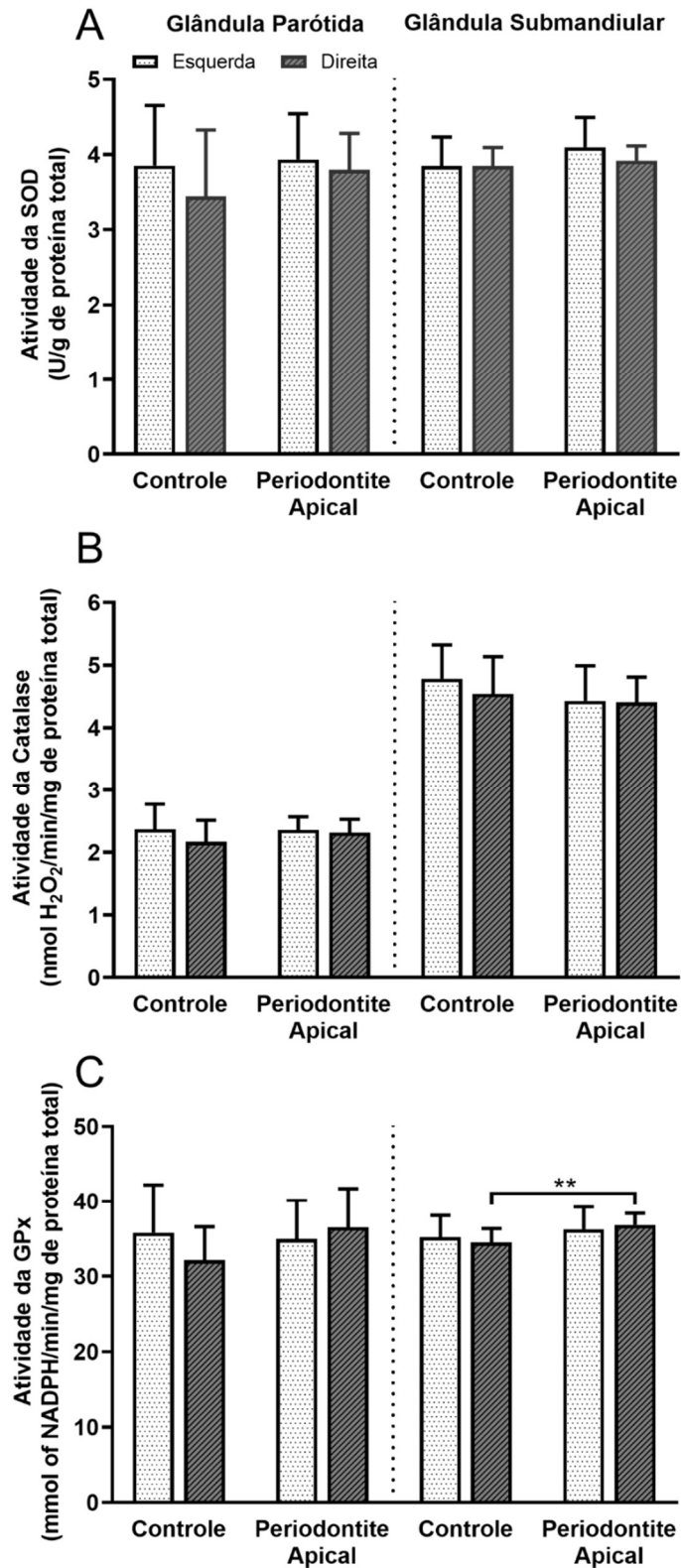
Foram avaliados os efeitos da periodontite apical na capacidade antioxidante total (A) e GSH (B) nos homogenatos das glândulas parótidas e submandibulares. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, com tamanho amostral de 10 ratos por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student não pareado para comparar os grupos Controle e Periodontite Apical, bem como o teste t

pareado para comparar as glândulas Esquerda e Direita.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo ( $*p < 0,05$ ).

#### **4.7 Análises da capacidade antioxidante enzimática**

As atividades da SOD (Figura 6A) e CAT (Figura 6B) nas glândulas parótida e submandibular foram semelhantes entre os grupos periodontite apical e controle. Da mesma forma, a atividade da GPx nas glândulas parótidas não apresentou diferenças entre os grupos experimentais. No entanto, nas glândulas submandibulares direitas, a periodontite apical aumentou ligeiramente a atividade da GPx em comparação com as glândulas direitas do grupo controle ( $p < 0,01$ ; Figura 6C).

Figura 6 – Efeitos da periodontite apical na atividade da SOD (A), CAT (B) e GPx (C) nos homogenatos das glândulas parótidas e submandibulares



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os efeitos da periodontite apical nas atividades da SOD (A), CAT (B) e GPx (C) nos homogenatos das glândulas parótidas e submandibulares foram investigados. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, com tamanho amostral de 10 ratos por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando o teste *t* de Student não pareado para comparar os grupos Controle e Periodontite Apical, bem como o teste *t* pareado para comparar as glândulas Esquerda e Direita.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo (\*\* $p < 0,01$ ).

## 5 DISCUSSÃO

Este estudo experimental avaliou os efeitos da periodontite apical sobre os parâmetros inflamatório, bioquímicos, funcionais e estado redox das glândulas salivares parótidas e submandibulares de ratos após 28 dias da lesão induzida. Os principais achados foram: 1. Houve o aumento da concentração do TNF- $\alpha$  apenas nas glândulas salivares adjacentes as lesões de periodontite apical; 2. Periodontite apical aumentou a concentração de proteína total salivar e atividade da amilase salivar; 3. Periodontite apical elevou a secreção de cloreto, potássio, cálcio e fosfato na saliva; 4. Apenas a glândula parótida adjacente a lesão periapical teve aumento da capacidade oxidante total; 5. Ambas as glândulas parótidas dos animais com periodontite apical tiveram menores capacidades antioxidantes totais em relação ao controle; 6. A atividade da GPx na glândula submandibular adjacente a periodontite apical aumentou discretamente. Assim, a hipótese nula foi rejeitada.

O modelo experimental de periodontite apical usado neste trabalho foi confirmado pela presença de células inflamatórias na região apical dos dentes, interrupção do ligamento periodontal e reabsorção óssea apical, conforme também demonstrado por outros estudos. (CINTRA et al., 2013, 2014a, 2014b; SAMUEL et al., 2019; JUSTO et al., 2022), os achados histológicos do presente estudo também demonstraram a presença de lesão periapical caracterizada por infiltrado de células inflamatórias na área ao redor do ápice dos dentes, desorganização do ligamento periodontal e reabsorção óssea. Além disso, a maior concentração da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  nas glândulas parótidas e submandibulares adjacentes as lesões periapicais ampliam o conhecimento sobre a extensão do processo inflamatório local no modelo de periodontite apical após 28 dias da sua indução, o que coincide também com a maior expressão de TNF- $\alpha$  nas áreas de lesões periapicais em ratos no mesmo período experimental (NASCIMENTO et al., 2022). Após 30 dias da indução da periodontite apical, TNF- $\alpha$  também demonstrou ser um importante marcador plasmático do processo inflamatório sistêmico (CINTRA et al., 2016), assim como do processo inflamatório local no osso periapical (AZUMA et al., 2017; CANTIGA-SILVA et al., 2021; JUSTO et al., 2022; VASQUES et al., 2023), independentemente do número dentes com lesão. Tal constatação ressalta sobre o risco de efeitos adversos da periodontite apical sobre as glândulas salivares, uma vez que o aumento da concentração tecidual de TNF- $\alpha$  foi associado com disfunções das glândulas salivares

nos modelos de doença periodontal marginal (EKUNI et al., 2010), sialodente tipo Sjogren (ZHOU; KAWAI; YU, 2017) e diabetes induzido por estreptozotocina (FUKUOKA et al., 2020) em roedores.

Os resultados deste trabalho confirmaram resultados prévios onde a periodontite apical induzida em ratos não alterou o peso corpóreo final (PEREIRA et al., 2017; SANTOS et al., 2023), além do consumo de ração (KRAMER et al., 2012; DAL-FABBRO et al., 2019; SANTOS et al., 2023) e água (DAL-FABBRO et al., 2019). Em contrapartida, o aumento do peso e do índice das glândulas parótidas adjacentes as lesões periapicais, associado ao aumento da capacidade oxidante total e do TNF- $\alpha$ , sinalizam maior vulnerabilidade desta glândula ao processo inflamatório, uma vez que esses parâmetros não diferirem entre os grupos nas glândulas submandibulares. Alterações nos pesos das glândulas salivares são associados com injúrias teciduais decorrentes de modelos experimentais de diabetes (BHATTARAI et al., 2018b), radioterapia (NAGLER; LAUFER, 1998; LEE et al., 2006), deficiência de testosterona (SANTOS et al., 2022) e em especial de doença periodontal marginal (NAKAMURA-KIYAMA et al., 2014; GONZÁLEZ et al., 2016; SHIKAYAMA et al., 2020). Apesar dos dados obtidos, a atrofia das glândulas parótidas e submandibulares foram associadas com o aumento de TNF- $\alpha$  plasmático em ratos submetidos ao modelo experimental de periodontite marginal (SHIKAYAMA et al., 2020). Tais discrepâncias, podem ser relacionadas as diferenças metodológicas e a intensidade do processo inflamatório, pois enquanto periodontite marginal experimental induzida por ligadura prevalece retenção mecânica, impação alimentar e consequente acúmulo de biofilme, ocasionando processo inflamatório ao redor de todos os tecidos dos dentes e reabsorção óssea sem exposição pulpar (LEE et al., 2013), na periodontite apical a indução é realizada promovendo exposição pulpar sendo que as lesões inflamatórias e a reabsorção são restritas ao osso periapical (DAL-FABBRO et al., 2021). Todavia, evidências que associam o aumento das concentrações de TNF- $\alpha$  com a hipertrofia das glândulas lacrimais e pulmões em ratos com doença periodontal experimental (SHIKAYAMA et al., 2020) e hiperplasia benigna da próstata em ratos (SHABANI et al., 2021) reforçam a relação do aumento do peso e índice da parótida com o TNF- $\alpha$ .

A periodontite apical em ratos não prejudicou a taxa de fluxo salivar, pH e capacidade tamponante, apesar do processo inflamatório periapical causar o aumento da concentração de TNF- $\alpha$  nas glândulas parótidas e submandibulares. A neutralidade

do pH salivar é mantida pelos agentes tamponantes proteína, fosfato inorgânico, além do sistema ácido carbônico/bicarbonato, que são mais relevantes na saliva em repouso e estimulada (TENOVUO, 1997), respectivamente. As evidências demonstraram que o pH e a capacidade tamponante não foram influenciados pelo aumento da secreção de proteína total e fosfato inorgânico nos animais com periodontite apical, o que poderia sinalizar possível prejuízo na secreção do sistema ácido carbônico/bicarbonato salivar semelhante ao que ocorre em pacientes com Síndrome de Sjogren após radioterapia na região da cabeça e pescoço (ALMSTÅHL; WIKSTRÖM, 2003). Na contra mão destes achados, modelo experimental de periodontite marginal induzida por ligadura em ratos foi associado com a redução da secreção salivar induzido pela pilocarpina (NAKAMURA-KIYAMA et al., 2014) e metacolina (AMER et al., 2011), o que reforça a existências de diferenças em relação a intensidade e severidade dos processos inflamatórios entre os modelos experimentais. Até o momento, não há informações sobre a função das glândulas salivares em pacientes com periodontite apical, embora em pacientes com inflamação pulpar e periapical haja um aumento da taxa de fluxo salivar associada com o estresse decorrente da dor dental aguda (HAUG; MARTHINUSSEN, 2019).

A despeito da normalidade da taxa de fluxo salivar estimulado por pilocarpina, os animais com periodontite apical tiveram alterações relevantes na composição bioquímica salivar caracterizado pelo aumento concomitante da concentração de proteína total e da atividade da amilase normalizada por mg de proteína total, sugerindo que a amilase contribuiu para o aumento de proteína total. Em ratos com periodontite marginal experimental os aumentos das secreções de proteína total e amilase na saliva não-estimulada e estimulada por isoproterenol foram associadas com a produção do mediador inflamatório prostaglandina-2 (MIOZZA et al., 2009). Estudo in vitro com células primárias da glândula parótida humana demonstrou também a capacidade do TNF- $\alpha$  em aumentar a expressão gênica da amilase (ARCE-FRANCO et al., 2017). Em humanos com periodontite marginal, a acentuada síntese e secreção de proteínas como a amilase é considerada estratégia para o aumento do potencial de proteção da saliva (HENSKENS et al., 1996). Por outro lado, a amilase contribui para o desenvolvimento do biofilme, através da interação dos estreptococos e consequente colonização na cavidade oral, o que tem levado a associação do aumento da amilase com o risco de cárie (AHMAD et al., 2022). Por fim, os canais

radiculares de dentes com lesões periapicais apresentam exsudato inflamatório rico em proteínas, dentre elas a albumina (MOHAMMADI, 2008), imunoglobulinas (KUO; LAMSTER; HASSELGREN, 1998) e citocinas pró-inflamatórias (SHIMAUCHI et al., 1996; PEZELJ-RIBARIĆ et al., 2007) que podem também contribuir pelo menos em parte com o aumento da concentração de proteína total na saliva.

A periodontite apical aumentou a concentração de cloreto, potássio, cálcio e fosfato na saliva. As células acinares secretam sódio e cloreto, que são responsáveis pela elevação da concentração osmótica, resultando na atração de água e formação da saliva primária (MELVIN et al., 2005; SNEYD et al., 2022). Subsequentemente, a saliva primária é modificada nos sistemas de ductos por trocas iônicas para atingir a neutralidade elétrica (SNEYD; CRAMPIN; YULE, 2014), por meio da secreção de potássio, bicarbonato, cálcio e fosfato, além da reabsorção de sódio e cloreto (HOMANN et al., 2006; ROUSSA, 2011; PATTERSON et al., 2012; IKUTA et al., 2019). Foi confirmado por meio de diferentes modelos inflamatórios a influência nas vias de sinalização intracelular e nas estruturas ductais envolvidas na secreção de eletrólitos. Em ratos com periodontite marginal o aumento da secreção do potássio pelas glândulas parótidas induzidas pelo carbacol, um agonista parassimpaticomimético, foi associado com o aumento da expressão de receptores muscarínicos na presença de maiores concentrações de prostaglandinas (MIOZZA; SÁNCHEZ; BUSCH, 2012). Por sua vez, ratos submetidos a obstrução ductal aguda das glândulas submandibulares o aumento da secreção de cloreto e sódio na saliva induzida por metacolina foi associado com a potencialização da sinalização de cálcio induzida pela inflamação (CARPENTER et al., 2007) e falha da função absorptiva das células ductais (CORREIA et al., 2008). Embora os resultados não demonstrem relação entre as alterações eletrolíticas e a taxa de fluxo salivar, o desequilíbrio da secreção de eletrólitos pode levar a perda da neutralidade elétrica, o que acentua a precipitação de proteínas, corroborando para a adesão de bactérias e aparecimento de cárie dentária (SCANNAPIECO, 1994; BROWN et al., 1999). Apesar das concentrações de cálcio e fosfato serem importantes na remineralização das lesões de cáries incipiente (LARSEN; FEJERKOV, 1989; GAFFAR; BLAKE-HASKINS; MELLBERG, 1993), a precipitação excessiva desses eletrólitos associado com a má higienização pode potencializar a formação de cálculo dentários, os quais são associados com gengivite e recessão gengival (WHITE, 1997). Logo, os resultados

aqui presentes levantam questões importantes que deverão ser consideradas em estudos clínicos sobre a relação da composição da saliva e a deterioração da saúde bucal em pacientes com periodontite apical.

Ao analisar os marcadores de estresse oxidativo nas glândulas salivares de ratos com periodontite apical, as glândulas parótidas adjacentes à lesão periapical apresentaram uma maior capacidade oxidante total, mas não houve alterações no dano oxidativo aos lipídios e as proteínas, o que pode ser explicado, pelo menos em parte, pela maior defesa antioxidante da glândula submandibular, conforme constatado nos modelos de diabetes induzida por estreptozotocina (ZALEWSKA et al., 2015; PERALTA et al., 2019) e deficiência de testosterona (SANTOS et al., 2022). Ao contrário desses achados, o modelo inflamatório de periodontite marginal em ratos aumentou o dano oxidativo ao DNA nas glândulas submandibulares adjacentes às lesões, bem como o aumento do potencial oxidante no soro. (EKUNI et al., 2010). O aumento do dano oxidativo aos lipídios também foi encontrado no soro de ratos após 30 dias da indução da periodontite apical unilateral no primeiro molar superior (PRIETO et al., 2017). Além disso, a resistência insulínica em ratos com periodontite apical nos primeiros molares superiores e inferiores do lado direito foi associada com a elevação concomitante da concentração plasmática de TNF- $\alpha$  e do dano oxidativo aos lipídios no músculo gastrocnêmio, enquanto a proteína carbonilada foi inalterada (SANTOS et al., 2023). Ademais, o aumento simultâneo do TNF- $\alpha$  e da peroxidação lipídica nas glândulas salivares de roedores foram associados com a redução do fluxo salivar nos modelos experimentais de intoxicação por 5-fluoracil (BOMFIN et al., 2017) e radioterapia (WU et al., 2021). Levando-se em conta que modificações temporais levam a uma adaptação do estado redox diante do estresse inflamatório agudo e crônico (LORENZEN et al., 2017), é plausível sugerir que as modificações bioquímicas salivares nos animais com periodontite apical podem ser reflexos de possíveis distúrbios oxidativos e inflamatórios que se iniciaram logo após a exposição pular, os quais seriam responsáveis por causar distúrbios do sistema nervoso autônomo parassimpático que media a secreção de água e eletrólitos (MIOZZA; SÁNCHEZ; BUSCH, 2012; BHATTARAI et al., 2018c), como também do sistema nervoso simpático que regula a secreção de proteínas e amilase (NATER; ROHLEDER, 2009; PROCTOR; SHAALAN, 2021), conforme também foi constatado nas glândulas

salivares de ratos com periodontite marginal (MIOZZA et al., 2009; NAKAMURA-KIYAMA et al., 2014).

Apesar da redução da capacidade antioxidante total nas glândulas parótidas adjacentes as lesões de periodontite apical, as concentrações de GSH, o mais importante antioxidante hidrofílico endógeno, não diferiram entre os grupos experimentais em ambas as glândulas após 28 dias da indução das lesões periapicais. Estudo clínico demonstrou que pacientes com periodontite apical crônica são expostos ao estresse oxidativo em função da redução da capacidade antioxidante plasmática (INCHINGOLO et al., 2013). Em contrapartida, a capacidade antioxidante total plasmática de ratos com periodontite apical se apresentou elevada após 14 e 28 dias de lesão induzida (FRAZÃO et al., 2023), enquanto outros estudos experimentais não demonstraram alterações na capacidade antioxidante total no soro (PRIETO et al., 2017) e no músculo gastrocnêmio (SANTOS et al., 2023) em ratos com periodontite apical. O GSH, que desempenha um papel fundamental na proteção contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, foi inferior no músculo gastrocnêmio de ratos com periodontite apical (SANTOS et al., 2023), enquanto sua concentração no soro não apresentou correlação com periodontite apical crônica em humanos (GOMES et al., 2018), e em ratos com periodontite apical após 28 dias da indução da lesão (FRAZÃO et al., 2023). Embora, a periodontite apical reduza a concentração hepática de GSH em ratos submetidos ao modelo de diabetes tipo 2 (WOLLE et al., 2013), o mesmo não foi observado em animais tratados com dieta rica em gordura (TIBÚRCIO-MACHADO et al., 2021b), o que destaca diferenças de vulnerabilidade das desordens metabólicas ao processo inflamatório induzido pelas lesões periapicais.

Distúrbios na defesa antioxidante não-enzimática ocasionam prejuízos na capacidade de síntese e secreção de proteínas e peptídeos salivares. A redução na expressão e secreção da amilase foram associados com a redução na defesa antioxidante nas glândulas salivares de ratos diabéticos (KANG et al., 2021) e tratado com o anticonvulsivante levetiracetam (FIAIS et al., 2023), respectivamente. Os resultados encontrados sugerem que o estresse oxidativo proveniente do processo inflamatório seja de baixa ou moderada intensidade, uma vez que a maioria dos marcadores do estado redox não foram alterados, e também não encontramos alterações no fluxo salivar. Levando-se em consideração a correlação entre o estresse

oxidativo e a inflamação, e que após a exposição pulpar inicia-se um processo patofisiológico de injúria e doença infecciosa que promove uma mudança transiente e gradual das células e marcadores inflamatórios com o envolvimento de diferentes mecanismos de morte celular (GOMES-FILHO et al., 2015; CHENG et al., 2018; PAULA-SILVA et al., 2020), torna-se necessário a condução de novas análises em estágios iniciais e tardios do desenvolvimento da periodontite apical induzida para revelar possíveis discrepâncias ou variações.

As atividades da SOD e CAT foram preservadas nas glândulas parótidas e submandibulares dos animais com periodontite apical, enquanto a GPx foi ligeiramente maior na glândula submandibular adjacente a lesão periapical, que pode ser considerada uma resposta compensatória ao aumento de espécies reativas de oxigênio, como também foi encontrado em neutrófilos polimorfonucleares sanguíneos de pacientes com lesões periapicais (MINCZYKOWSKI et al., 2001). A análise de lesões periapicais em humanos demonstrou relação entre a reabsorção óssea e o aumento da peroxidação lipídica, SOD e GPx, enquanto a CAT não foi alterada (GUERRERO-BOBADILLA et al., 2020). A mesma relação entre perda óssea periapical e estresse oxidativo foi associada ao aumento da peroxidação lipídica, redução da GPx, e estabilidade da SOD em lesões periapicais em humanos (MARTON et al., 1993). Os resultados experimentais deste trabalho sugerem assincronia entre as alterações do estado redox nas glândulas salivares e a disfunção da composição bioquímica da saliva dos animais com periodontite apical induzida. Resultado análogo foi encontrado em ratos com resistência insulínica induzida pela periodontite apical, onde as atividades da SOD, CAT e GPx foram inalteradas no músculo gastrocnêmio (SANTOS et al., 2023). Além disso, evidências sugerem uma vulnerabilidade tecido específica ao estresse oxidativo induzida pela periodontite apical em ratos. A análise de órgãos periféricos de ratos com lesões periapicais nos primeiros molares inferiores direito não constatou relação entre formação de espécies reativas e a atividade da catalase, a qual foi maior no fígado e rins, inferior no pâncreas e sem alterações no coração (BARCELOS et al., 2020). Ao contrário de nossos resultados, o aumento na concentração de TNF- $\alpha$  nas glândulas salivares de ratos foi associado a um aumento na peroxidação lipídica e a uma redução nas enzimas antioxidantes em animais submetidos a modelos experimentais de radioterapia (WU et al., 2021), dieta rica em gordura (ZALEWSKA et al., 2021), diabetes tipo 2 (CHEN

et al., 2020) e quimioterapia (MOSTAFA; IBRAHIM; BORAI, 2023). Os achados acima reforçam a hipótese de uma assincronia entre TNF- $\alpha$ , marcadores de estresse oxidativo e a disfunção da glândula salivar induzida pela periodontite apical. Esse resultado também pode ser reflexo da transição de pulpíte ou periodontite apical aguda para a periodontite apical crônica que costuma ocorrer de forma rápida e com estágios não claramente definidos (NAIR, 1997; RECHENBERG et al., 2016).

Assim, embora os resultados encontrados confirmem a presença de disfunção das glândulas salivares após 28 dias da indução da periodontite apical, as discretas alterações locais encontradas nos parâmetros do estado redox, nos levam a considerar a possibilidade de que outros mecanismos patofisiológicos estão envolvidos nas alterações da síntese e secreção dos componentes bioquímicos salivares ao longo do curso do desenvolvimento da periodontite apical, sendo necessária a condução de novos estudos com humanos e animais a fim de compreender com maior precisão estes mecanismos. Além disso, se faz necessário também avaliar se as alterações bioquímicas encontradas serão reproduzidas em delineamentos experimentais utilizando menor número de dentes e diferentes intervalos de tempo.

## **6 CONCLUSÃO**

A periodontite apical experimental altera a composição bioquímica salivar, além de aumentar os marcadores inflamatórios e induzir distúrbios locais do estado redox nas glândulas parótidas e submandibulares de ratos machos.

## REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AHMAD, P. *et al.* Salivary proteins as dental caries biomarkers: a systematic review. **Caries Research**, v. 56, p. 385–398, 2022.
- ALMSTÅHL, A.; WIKSTRÖM, M. Electrolytes in stimulated whole saliva in individuals with hyposalivation of different origins. **Archives of Oral Biology**, v. 48, n. 5, p. 337–344, 2003.
- AMER, M. *et al.* Reduced methacholine-induced submandibular salivary secretion in rats with experimental periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 5, p. 421–427, 2011.
- ARCE-FRANCO, M. *et al.* Functional effects of proinflammatory factors present in Sjogren's syndrome salivary microenvironment in an in vitro model of human salivary gland. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 11897, 2017.
- ASTOLPHI, R. D. *et al.* Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 5, p. 648–652, 2013.
- ASTOLPHI, R. D. *et al.* Periapical lesions decrease insulin signaling in rat skeletal muscle. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 8, p. 1305–1310, 2015.
- AZUMA, M. M. *et al.* Omega 3 fatty acids reduce bone resorption while promoting bone generation in rat apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 6, p. 970–976, 2017.
- BAG, A. K. *et al.* Imaging of inflammatory disorders of salivary glands. **Neuroimaging Clinics of North America**, v. 28, n. 2, p. 255–272, 2018.
- BARCELOS, R. C. S. *et al.* Apical periodontitis induces changes on oxidative stress parameters and increases Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in adult rats. **Archives of Oral Biology**, v. 118, p. 104849, 2020.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882–888, 1963.

BHATTARAI, K. R. *et al.* Potential application of ixeris dentata in the prevention and treatment of aging-induced dry mouth. **Nutrients**, v. 10, n. 12, p. 1989, 2018a.

BHATTARAI, K. R. *et al.* Ixeris dentata extract increases salivary secretion through the regulation of endoplasmic reticulum stress in a diabetes-induced xerostomia rat model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1059, 2018b.

BHATTARAI, K.R. *et al.* The imprint of salivary secretion in autoimmune disorders and related pathological conditions. **Autoimmunity Reviews**, v. 17, n. 4, p. 376–390, 2018c.

BOMFIN, L. E. *et al.* 5-Fluorouracil induces inflammation and oxidative stress in the major salivary glands affecting salivary flow and saliva composition. **Biochemical Pharmacology**, v. 145, p. 34–45, 2017.

BROWN, A. E. *et al.* Prevalence of the Amylase-Binding Protein A Gene (abpA) in oral streptococci. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 4081–4085, 1999.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302–310, 1978.

BUSCH, L. *et al.* Increased leukotriene concentration in submandibular glands from rats with experimental periodontitis. **Inflammation Research**, v. 58, n. 7, p. 423–430, 2009.

BUSCH, L.; STERIN-BORDA, L.; BORDA, E. Beta-adrenoceptor alterations coupled with secretory response and experimental periodontitis in rat submandibular glands. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 6, p. 509–516, 2008.

CANTIGA-SILVA, C. *et al.* Inflammatory profile of apical periodontitis associated with liver fibrosis in rats: histological and immunohistochemical analysis. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 8, p. 1353–1361, 2021.

CARPENTER, G. H. *et al.* Rat salivary gland ligation causes reversible secretory hypofunction. **Acta Physiologica**, v. 189, n. 3, p. 241–249, 2007.

- CHEN, S. *et al.* Decreased basal and stimulated salivary parameters by histopathological lesions and secretory dysfunction of parotid and submandibular glands in rats with type 2 diabetes. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 19, p. 2707–2719, 2020.
- CHENG, R. *et al.* The extent of pyroptosis varies in different stages of apical periodontitis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 1, p. 226–237, 2018.
- CINTRA, L. T. A. *et al.* Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats. **Clinical Oral Investigations**, v. 17, n. 6, p. 1595–1599, 2013.
- CINTRA, L. T. A. *et al.* Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 8, p. 1139–1144, 2014a.
- CINTRA, L. T. A. *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. 228–237, 2014b.
- CINTRA, L. T. A. *et al.* Multiple Apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 5, p. 747–751, 2016.
- CONTI, L. C. *et al.* Relationship between apical periodontitis and atherosclerosis in rats: lipid profile and histological study. **International Endodontic Journal**, v. 53, n. 10, p. 1387–1397, 2020.
- CORREIA, P. N. *et al.* Acute salivary gland hypofunction in the duct ligation model in the absence of inflammation. **Oral Diseases**, v. 14, n. 6, p. 520–528, 2008.
- CYPRIANO, M. L. *et al.* Effect of testosterone replacement therapy and mate tea (*Ilex paraguariensis*) on biochemical, functional and redox parameters of saliva in orchietomized rats. **Archives of Oral Biology**, v. 132, p. 1052891, 2021.
- DAL-FABBRO, R. *et al.* Chronic alcohol consumption increases inflammation and osteoclastogenesis in apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 3, p. 329–336, 2019.
- DAL-FABBRO, R. *et al.* Excessive caffeine intake increases bone resorption associated with periapical periodontitis in rats. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 10, p. 1861–1870, 2021.

OLIVEIRA, A. C. F. *et al.* Analysis of salivary flow rate, biochemical composition, and redox status in orchietomized spontaneously hypertensive rats. **Archives of Oral Biology**, v. 152, p. 105732, 2023.

NASCIMENTO, I. V. *et al.* Chronic systemic corticosteroid therapy influences the development of pulp necrosis and experimental apical periodontitis, exacerbating the inflammatory process and bone resorption in rats. **International Endodontic Journal**, v. 55, n. 6, p. 646–659, 2022.

SANTOS, D. R. *et al.* Effects of orchietomy and testosterone replacement therapy on redox balance and salivary gland function in Wistar rats. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 218, p. 106048, 2022.

SANTOS, R. M. *et al.* Melatonin decreases plasma TNF- $\alpha$  and improves nonenzymatic antioxidant defence and insulin sensitivity in rats with apical periodontitis fed a high-fat diet. **International Endodontic Journal**, v. 56, n. 2, p. 164–178, 2023.

EBISUI, L.; FONTES, R. S.; LAPCHIK, V. B. V. Rato. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 229–250.

EKUNI, D. *et al.* Imbalance of oxidative/anti-oxidative status induced by periodontitis is involved in apoptosis of rat submandibular glands. **Archives of Oral Biology**, v. 55, n. 2, p. 170–176, 2010.

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1103–1111, 2005.

FAGUNDES, N. C. F. *et al.* Binge drinking of ethanol during adolescence induces oxidative damage and morphological changes in salivary glands of female rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 7323627, 2016.

FIAIS, G. A. *et al.* Assessment of the toxic effects of levetiracetam on biochemical, functional, and redox parameters of salivary glands in male Wistar rats. **Toxicology**, v. 496, p. 153615, 2023.

FRAZÃO, D. R. *et al.* Modulation of blood redox status by the progression of induced apical periodontitis in rats. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1214990, 2023.

FUKUOKA, C. *et al.* Early effect of laser irradiation in signaling pathways of diabetic rat submandibular salivary glands. **PloS One**, v. 15, n. 8, p. e0236727, 2020.

GAFFAR, A.; BLAKE-HASKINS, J.; MELLBERG, J. In vivo studies with a dicalcium phosphate dihydrate/MFP system for caries prevention. **International Dental Journal**, v. 43, p. 81–88, fev. 1993.

GOMES, C. *et al.* increased root canal endotoxin levels are associated with chronic apical periodontitis, increased oxidative and nitrosative stress, major depression, severity of depression, and a lowered quality of life. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 4, p. 2814–2827, 2018.

GOMES, M. S. *et al.* Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? A systematic review and meta-analysis. **Journal of Endodontics**, v. 39, p. 1205–1237, 2013.

GOMES-FILHO, J. E. *et al.* Effect of raloxifene on periapical lesions in ovariectomized rats. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 5, p. 671–675, 2015.

GONZÁLEZ, C. R. *et al.* Immunolocalization of the tgfb1 system in submandibular gland fibrosis after experimental periodontitis in rats. **Acta Odontologica Latinoamericana**, v. 29, p. 138–143, 2016.

GUERRERO-BOBADILLA, C. *et al.* Reduction of Nrf2 as coadjuvant during the development of persistent periapical lesions. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 28, p. 404–411, 2020.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422–427, 1972.

HAUG, S.; MARTHINUSSEN, M. Acute dental pain and salivary biomarkers for stress and inflammation in patients with pulpal or periapical inflammation. **Journal of Oral & Facial Pain and Headache**, v. 33, n. 2, p. 227–233, 2019.

- HENSKENS, Y. M. C. *et al.* Effect of periodontal treatment on the protein composition of whole and parotid saliva. **Journal of Periodontology**, v. 67, n. 3, p. 205–212, 1996.
- HOMANN, V. *et al.* Calcium transport in human salivary glands: A proposed model of calcium secretion into saliva. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 125, n. 5, p. 583–591, 2006.
- IBUKI, F. K. *et al.* Effect of vitamin C and E on oxidative stress and antioxidant system in the salivary glands of STZ-induced diabetic rats. **Archives of Oral Biology**, v. 116, p. 104765, 2020.
- IKUTA, K. *et al.* Systemic network for dietary inorganic phosphate adaptation among three organs. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 471, n. 1, p. 123–136, 2019.
- INCHINGOLO, F. *et al.* Influence of endodontic treatment on systemic oxidative stress. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, n. 1, p. 1–6, 2013.
- JAKOVLJEVIC, A. *et al.* Prevalence of apical periodontitis and conventional nonsurgical root canal treatment in general adult population: an updated systematic review and meta-analysis of cross-sectional studies published between 2012 and 2020. **Journal of Endodontics**, v. 46, n. 10, p. 1371–1386, 2020.
- JUSTO, M. P. *et al.* Curcumin reduces inflammation in rat apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 55, n. 11, p. 1241–1251, 2022.
- KANG, W. S. *et al.* Gemigliptin suppresses salivary dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111297, 2021.
- KRAMER, P.R. *et al.* A non-invasive model for measuring nociception after tooth pulp exposure. **Journal of Dental Research**, v. 91, n. 9, p. 883–887, 2012.
- KUO, M. L.; LAMSTER, I. B.; HASSELGREN, G. Host mediators in endodontic exudates. II. Changes in concentration with sequential sampling. **Journal of Endodontics**, v. 24, n. 10, p. 636–640, 1998.

LARSEN, M. J.; FEJERKOV, O. Chemical and structural challenges in remineralization of dental enamel lesions. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 97, n. 4, p. 285–296, 1989.

LEE, H. J. *et al.* Radioprotective effect of heat shock protein 25 on submandibular glands of rats. **The American Journal of Pathology**, v. 169, n. 5, p. 1601–1611, 2006.

LEE, J. H. *et al.* The adaptive nature of the bone-periodontal ligament-cementum complex in a ligature-induced periodontitis rat model. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 876316, 2013.

LORENZEN, I. *et al.* Redox regulation of inflammatory processes is enzymatically controlled. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 8459402, 2017.

MACIEJCZYK, M. *et al.* Antioxidant defense, oxidative modification, and salivary gland function in an early phase of cerulein pancreatitis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, p. 8403578, 2019.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.

MARTON, I. J. *et al.* The role of reactive oxygen intermediates in the pathogenesis of chronic apical periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 8, p. 254–257, 1993.

MELVIN, J. E. *et al.* Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 445–469, 2005.

MESQUITA, C. S. *et al.* Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 458, p. 69–71, 2014.

MINCZYKOWSKI, A. *et al.* Hydrogen peroxide and superoxide anion production by polymorphonuclear neutrophils in patients with chronic periapical granuloma, before and after surgical treatment. **Clinical Oral Investigations**, v. 5, n. 1, p. 6–10, 2001.

MIOZZA, V. *et al.* Experimental periodontitis induces a cAMP-dependent increase in amylase activity in parotid glands from male rats. **Inflammation**, v. 32, n. 6, p. 357–363, 2009.

MIOZZA, V. *et al.* Increase nitric oxide synthase activity in parotid glands from rats with experimental periodontitis. **Oral Diseases**, v. 16, n. 8, p. 801–806, 2010.

MIOZZA, V. *et al.* Enhancement of carbachol-induced amylase secretion in parotid glands from rats with experimental periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 12, p. 1514–1520, 2011.

MIOZZA, V. A.; SÁNCHEZ, G. A.; BUSCH, L. Influence of experimental periodontitis on cholinergic stimulation of K<sup>+</sup> release in rat parotid glands. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 169, n. 1, p. 43–48, 2012.

MIRANDA, L. F. B. *et al.* Effect of processing methods of human saliva on the proteomic profile and protein-mediated biological processes. **Journal of Proteome Research**, v. 22, n. 3, p. 857–870, 2023.

MOHAMMADI, Z. Chlorhexidine gluconate, its properties and applications in endodontics. **Iranian Endodontic Journal**, v. 2, p.113–125, 2008.

MOSTAFA, O. A. A.; IBRAHIM, F.; BORAI, E. Protective effects of hesperidin in cyclophosphamide-induced parotid toxicity in rats. **Scientific Reports**, v. 13, p. 158, 2023.

NAGLER, R. M.; LAUFER, D. Protection against irradiation-induced damage to salivary glands by adrenergic agonist administration. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 40, n. 2, p. 477–481, 1998.

NAIR, P. N. R. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. **Periodontology 2000**, v. 13, n. 1, p. 121–148, 1997.

NAKAMURA-KIYAMA, M. *et al.* Changes of salivary functions in experimental periodontitis model rats. **Archives of Oral Biology**, v. 59, n. 2, p. 125–132, 2014.

NATER, U. M.; ROHLEDER, N. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, p. 486–496, 2009.

ÖZGÜR, A. *et al.* Protective effect of whortleberry extract on salivary gland damage induced by neck irradiation in rats. **Ear, Nose, Throat Journal**, v. 98, n. 6, p. 64–69, 2019.

PATTERSON, K. *et al.* A quantitative analysis of electrolyte exchange in the salivary duct. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 303, p. 1153–1163, 2012.

PAULA-SILVA, F. W. G. *et al.* Root canal contamination or exposure to lipopolysaccharide differentially modulate prostaglandin E 2 and leukotriene B 4 signaling in apical periodontitis. **Journal of Applied Oral Science**, v. 28, p. 1–9, 2020.

PERALTA, I. *et al.* Larrea divaricata Cav. aqueous extract and nordihydroguariaretic acid modulate oxidative stress in submandibular glands of diabetic rats: A buccal protective in diabetes. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, p. 227, 2019.

PEREIRA, R.F. *et al.* Periapical lesions increase macrophage infiltration and inflammatory signaling in muscle tissue of rats. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 6, p. 982–988, 2017.

PEZELJ-RIBARIĆ, S. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha in peripical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. **Mediators of Inflammation**, v. 2007, p. 69416, 2007.

PRIETO, A. K. C. *et al.* Influence of apical periodontitis on stress oxidative parameters in diabetic rats. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 10, p. 1651–1656, 2017.

PROCTOR, G. B.; SHAALAN, A. M. Disease-induced changes in salivary gland function and the composition of saliva. **Journal of Dental Research**, v. 100, n. 11, p. 1201–1209, 2021.

RASHMI, N. *et al.* Assessment of C-reactive proteins, cytokines, and plasma protein levels in hypertensive patients with apical periodontitis. **Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 18, n. 6, p. 516–521, 2017.

- RECHENBERG, D. K. *et al.* Pain levels and typical symptoms of acute endodontic infections: a prospective, observational study. **BMC Oral Health**, v. 16, n. 1, p. 61, 2016.
- RIVERA, E. B. Bem-estar animal. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e manejo de animais de laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 59–69.
- ROUSSA, E. Channels and transporters in salivary glands. **Cell and Tissue Research**, v. 343, n. 2, p. 263–287, 2011.
- SAMANOVIC, A. M. *et al.* Cardiac, biochemical and histopathological analysis reveals impaired heart function in hypertensive rats with apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 9, p. 1581–1596, 1 set. 2021.
- SAMUEL, R. O. *et al.* Th1/Th2/Th17/Treg balance in apical periodontitis of normoglycemic and diabetic rats. **Journal of Endodontics**, v. 45, n. 8, p. 1009–1015, 2019.
- SASAKI, H. *et al.* Interrelationship between periapical lesion and systemic metabolic disorders. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 15, p. 2204–2215, 2016.
- SCANNAPIECO, F. A. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.5, p. 203–248, 1994.
- SEGURA-EGEA, J. J.; MARTÍN-GONZÁLEZ, J.; CASTELLANOS-COSANO, L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. **International Endodontic Journal**, v. 48, n. 10, p. 933–951, 2015.
- SHABANI, E. *et al.* Berberine ameliorates testosterone-induced benign prostate hyperplasia in rats. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 21, n. 1, p. 773, 2021.
- SHIKAYAMA, T. *et al.* Hematogenous apoptotic mechanism in salivary glands in chronic periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v. 117, p. 104775, 2020.
- SHIMAUCHI, H. *et al.* Development of a quantitative sampling method for periapical exudates from human root canals. **Journal of Endodontics**, v. 22, p. 612–615, 1996.

SKUTNIK-RADZISZEWSKA, A. *et al.* Salivary antioxidants and oxidative stress in psoriatic patients: can salivary total oxidant status and oxidative status index be a plaque psoriasis biomarker? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 9086024, 2020.

SNEYD, J.; CRAMPIN, E.; YULE, D. Multiscale modelling of saliva secretion. **Mathematical Biosciences**, v. 257, p. 69–79, 2014.

SNEYD, J. *et al.* Simulation of calcium dynamics in realistic three-dimensional domains. **Biomolecules**, v. 12, n. 10, p. 1455, 2022.

STYS, L. P. A. *et al.* Serum levels of inflammatory markers and HbA1c in patients with type 2 diabetes and apical periodontitis: preliminary findings. **Australian Endodontic Journal**, v. 48, n. 1, p. 105–115, 2022.

TAKAHASHI, A. *et al.* Evaluation of the effects of quercetin on damaged salivary secretion. **PloS One**, v. 10, n. 1, p. e0116008, 2015.

TENOVUO, J. Community dentistry and oral epidemiology salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. **Community Dentistry Oral Epidemiology**, v. 25, n. 1, p. 82–86, 1997.

TIBÚRCIO-MACHADO, C. S. *et al.* The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **International endodontic journal**, v. 54, n. 5, p. 712–735, 2021a.

TIBÚRCIO-MACHADO, C. S. *et al.* High-fat diet effect on periapical lesions and hepatic enzymatic antioxidant in rats. **Life Science**, v. 264, p. 118637, 2021b.

TSOSURA, T. V. S. *et al.* Maternal apical periodontitis is associated with insulin resistance in adult offspring. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 7, p. 1040–1050, 2019.

TSOSURA, T. V. S. *et al.* Maternal apical periodontitis increases insulin resistance and modulates the antioxidant defense system in the gastrocnemius muscle of adult offspring. **Journal of Endodontics**, v. 47, n. 7, p. 1126–1131, 2021.

VASQUES, A. M. V. *et al.* Inflammatory profile of apical periodontitis exacerbated by cigarette smoke inhalation: Histological and immunohistochemical analysis in rats. **International Endodontic Journal**, v. 56, n. 4, p. 465–474, 2023.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325–333, 1981.

WHITE, D. J. Dental calculus: recent insights into occurrence, formation, prevention, removal and oral health effects of supragingival and subgingival deposits. **European Journal of Oral Sciences**, v. 105, n. 5, p. 508–522, 1997.

WOLLE, C. F. B. *et al.* Outcome of periapical lesions in a rat model of type 2 diabetes: refractoriness to systemic antioxidant therapy. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 5, p. 643–647, 2013.

WU, Y. H. *et al.* Effect of ischemic preconditioning on radiation damage to the submandibular gland in rats. **European Journal of Oral Sciences**, v. 129, n. 3, p. 12785, 2021.

XIAO, S. *et al.* Is oxidative stress involved in the hepatic inflammatory response to apical periodontitis? A comparative study in normal and hyperlipidaemic rat. **International endodontic journal**, v. 56, n. 6, p. 722–733, 2023.

YOON, Y. J. *et al.* Salivary gland organoid culture maintains distinct glandular properties of murine and human major salivary glands. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 3291, 2022.

ZALEWSKA, A. *et al.* Antioxidant profile, carbonyl and lipid oxidation markers in the parotid and submandibular glands of rats in different periods of streptozotocin induced diabetes. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 9, p. 1375–1386, 2015.

ZALEWSKA, A. *et al.* N-acetylcysteine supplementation did not reverse mitochondrial oxidative stress, apoptosis, and inflammation in the salivary glands of hyperglycemic rats. **Nutrition and Diabetes**, v. 11, n. 1, p. 35, 2021.

ZHOU, J.; KAWAI, T.; YU, Q. Pathogenic role of endogenous TNF- $\alpha$  in the development of Sjögren's-like sialadenitis and secretory dysfunction in non-obese diabetic mice. **Laboratory Investigation**, v. 97, n. 4, p. 458–467, 2017.

ZUKOWSKI, P. *et al.* Effect of N-Acetylcysteine on antioxidant defense, oxidative modification, and salivary gland function in a rat model of insulin resistance. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, p. 6581970, 2018.

## ANEXOS

### ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal



#### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação da composição salivar e estado redox das glândulas salivares de ratos Wistar portadores de periodontite apical induzida**", Processo FOA nº 0374-2022, sob responsabilidade de Antonio Hernandes Chaves Neto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 30 de Maio de 2022.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 31 de Dezembro de 2025.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 31 de Janeiro de 2026.

#### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of salivary composition and redox status of salivary glands in Wistar rats with induced apical periodontitis**", Protocol FOA nº 0374-2022, under the supervision of Antonio Hernandes Chaves Neto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 30, 2022.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** December 31, 2025.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** January 31, 2026.

**Prof. Dr. João Carlos Callera**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator