



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

Lucas Rodrigues de Araújo Estrela

**Influência do desenvolvimento e progressão da Periodontite
Apical sobre parâmetros sanguíneos, histológicos e
microtomográficos**

Araçatuba - SP
2024

Lucas Rodrigues de Araújo Estrela

**Influência do desenvolvimento e progressão da Periodontite
Apical sobre parâmetros sanguíneos, histológicos e
microtomográficos**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de Mestre

Área de Concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Galera Bernabé

Araçatuba - SP
2024

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

E82i Estrela, Lucas Rodrigues de Araújo.
Influência do desenvolvimento e progressão da periodontite apical sobre parâmetros sanguíneos, histológicos e microtomográficos / Lucas Rodrigues de Araújo Estrela. - Araçatuba, 2024
47 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra

1. Periodontite periapical 2. Endodontia 3. Contagem de células sanguíneas 4. Odontologia I. T.

Black D24
CDD 617.67

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedico este trabalho aos meus avós, Maria e Odilon (*in memoriam*), que sempre se fazem presentes em minha vida, sempre a lembrança viva e carinhosa destes guardiões incansáveis e queridos.

Aos meus pais, Cyntia e Carlos, pela vida, pelo amor, dedicação, valores, pelos ensinamentos, pela proteção e caminhada. Eu amo vocês.

Aos meus irmãos, Matheus, Maria Cristina e Pedro, inseparáveis, companheiros de fé, de vida, estrada, gratidão pela união e carinho de sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, fonte de luz do multiverso, a todas as oportunidades que tenho recebido, em especial de buscar a evolução espiritual e poder servir de instrumento para servir aos irmãos necessitados.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra, por ter aceitado o desafio de me acompanhar neste início de vida acadêmica, pelas oportunidades, aprendizado, convívio e orientação. Gratidão por tudo.

Agradeço aos Professores da Endodontia, Prof. Elói Dezan-Junior, Prof. Gustavo Sivieri de Araújo, Prof. João Eduardo Gomes Filho e Prof. Rogério de Castilho Jacinto, por todo o convívio, atenção, momentos de aprendizagem, disposição nos ensinamentos, e pela convivência no Departamento. Gratidão de sempre.

Agradeço aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências pelas oportunidades e ensinamentos nos seminários.

Agradeço aos Colegas de Pós-Graduação em Ciências pela convivência e aprendizado. Muito obrigado.

Agradeço aos Funcionários da FOA, Técnicos, Servidores, Pacientes, pela atenção, dedicação e amizade.

Agradeço aos animais que serviram de instrumentos ao meu aprendizado, meu respeito.

Agradeço a Faculdade de Odontologia de Araçatuba - FOA, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, na pessoa do seu Diretor Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem e Vice-Diretor Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra. Muito obrigado pela acolhida e por poder conhecer um curso pós-graduação stricto-sensu e um laboratório de pesquisa. Gratidão por participar da FOAraçatuba-UNESP.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 - pela concessão de bolsa de Mestrado e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação Lato-sensu em Endodontia da FOA-Araçatuba-Unesp.

“ Aprenda a gostar, mas gostar mesmo, das coisas que deve fazer e das pessoas que o cercam. Em pouco tempo descobrirá que a vida é muito boa e que você é uma pessoa querida por todos. “

Rubem Alves

RESUMO

ESTRELA, L. R. A. **Influência do desenvolvimento e progressão da Periodontite Apical sobre parâmetros sanguíneos, histológicos e microtomográficos.** 2024. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

Este estudo teve como objetivo analisar a influência do desenvolvimento e progressão da Periodontite Apical (PA) sobre parâmetros sanguíneos, histológicos e microtomográfico. Trinta e dois ratos machos Wistar foram divididos em quatro grupos (n=8): Controle – ratos sem PA, PA7 – ratos com PA de 7 dias, PA14 – ratos com PA de 14 dias, e PA28 – ratos com PA de 28 dias. A PA foi induzida pela exposição dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito. Após os períodos experimentais, o sangue foi coletado para análises de Hemograma completo e estresse oxidativo para Capacidade antioxidante total (CAT), Concentração oxidante total (COT) e Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT). Em seguida, os animais foram eutanasiados e as maxilas e mandíbulas foram coletadas para análise histológica e microtomográfica. Os resultados foram analisados por testes estatísticos específicos ($p < 0,05$). A análise sanguínea da série vermelha revelou redução do número de Hemácias e Hemoglobina no grupo PA7 comparado aos demais grupos ($p < 0,05$); aumento do Volume corpuscular médio em todos os grupos com PA em relação ao controle ($p < 0,05$), sendo o maior volume no grupo PA7 com diferença para os grupos PA14 e PA28 ($p < 0,05$); redução da Concentração de hemoglobina corpuscular média no grupo PA7 em relação aos demais grupos ($p < 0,05$); e redução da Largura da distribuição das células vermelhas no grupo PA14 em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Não houve diferença para hematócrito, contagem de Plaquetas e Proteína plasmática total entre os grupos ($p > 0,05$). A análise sanguínea da série branca revelou aumento de leucócitos, neutrófilos e linfócitos em todos os grupos com PA em relação ao controle ($p < 0,05$). Não houve diferença para Eosinófilo, Bastonetes e Monócito entre os grupos ($p > 0,05$). Quanto ao estresse oxidativo sérico, pode-se observar redução do CAT e aumento do COT e SRAT nos grupos com PA, comparados ao controle ($p < 0,05$). A análise histológica revelou presença de inflamação periapical em todos os grupos com PA, diferentes do controle ($p < 0,05$). No grupo PA14 a inflamação foi moderada

e no grupo PA28 foi severa, sem diferenças entre si ($p>0,05$), mas diferentes do PA7, que apresentou inflamação discreta ($p<0,05$). A análise microtomográfica revelou progressão da reabsorção óssea em função do tempo, apresentando diferença entre todos os grupos ($p<0,05$). Conclui-se que o desenvolvimento e progressão da PA altera a morfologia e o padrão da expressão das células sanguíneas, assim como o estresse oxidativo sérico. Além disso, a severidade da inflamação e reabsorção óssea periapical se agravam com o tempo de desenvolvimento da PA.

Palavras-chave: Periodontite periapical; endodontia; contagem de células sanguíneas; odontologia.

ABSTRACT

ESTRELA, L. R. A. **Influence of the development and progression of Apical Periodontitis on blood, histological and microtomographic parameters.** 2024. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

This study aimed to analyze the influence of the development and progression of Apical Periodontitis (AP) on blood parameters, histological, and microtomographic features. Thirty-two male Wistar rats were divided into four groups (n=8): Control - rats without AP, AP7 - rats with AP for 7 days, AP14 - rats with AP for 14 days, and AP28 - rats with AP for 28 days. AP was induced by exposing the first and second upper and lower molars on the right side. After the experimental periods, blood was collected for Complete Blood Count and oxidative stress for Total Antioxidant Capacity (TAC), Total Oxidant Concentration (TOC), and Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS). Then, the animals were euthanized, and the jaws and mandibles were collected for histological and microtomographic analysis. The results were analyzed using specific statistical tests ($p < 0.05$). Blood analysis of the red series revealed a reduction in the number of Red Blood Cells and Hemoglobin in the AP7 group compared to the other groups ($p < 0.05$); an increase in Mean Corpuscular Volume in all AP groups compared to the control ($p < 0.05$), with the highest volume in the AP7 group compared to the AP14 and AP28 groups ($p < 0.05$); a reduction in Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration in the AP7 group compared to the other groups ($p < 0.05$); and a reduction in Red Cell Distribution Width in the AP14 group compared to the other groups ($p < 0.05$). There was no difference in Hematocrit, Platelet count, and Total plasma protein between the groups ($p > 0.05$). White series blood analysis revealed an increase in Leukocytes, Neutrophils, and Lymphocytes in all AP groups compared to the control ($p < 0.05$). There was no difference in Eosinophils, Basophils, and Monocytes between the groups ($p > 0.05$). Regarding serum oxidative stress, a reduction in TAC and an increase in TOC and TBARS were observed in the AP groups compared to the control ($p < 0.05$). Histological analysis revealed the presence of periapical inflammation in all AP groups, unlike the control ($p < 0.05$). In the AP14 group, inflammation was moderate, and in the AP28 group, it was severe, with no

differences between them ($p>0.05$), but different from AP7, which presented mild inflammation ($p<0.05$). Microtomographic analysis revealed progression of bone resorption over time, with differences between all groups ($p<0.05$). It is concluded that the development and progression of AP alter the morphology and expression pattern of blood cells, as well as serum oxidative stress. Furthermore, the severity of periapical inflammation and bone resorption worsens with the development time of AP.

Keywords: Periapical periodontitis; endodontics; blood cell count; dentistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Procedimento de exposição pulpar	20
Figura 2 - Imagem dos cortes histológicos em He em diferentes aumentos	33
Figura 3 - Imagem coronal de microtomografia	34
Figura 4 - Imagem transaxial de microtomografia	34
Figura 5 - Imagem sagital de microtomografia	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Valores obtidos do eritrograma nos diferentes grupos 28
experimentais⁴

Gráfico 2 - Valores obtidos do WBC, neutrófilos e linfócitos nos 30
diferentes grupos experimentais

Gráfico 3 - Valores obtidos do estresse oxidativo nos diferentes grupos 31
experimentais

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de Eritrócitos no sangue	27
Tabela 2 - Concentração de leucócitos no sangue	29
Tabela 3 - Estresse Oxidativo no sangue	31
Tabela 4 - Escores e mediana de intensidade de células inflamatórias	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT	Capacidade Antioxidante Total
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
COT	Concentração de Oxidante Total
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
HGB	Hemoglobina
PA	Periodontite Apical
PLT	Plaquetas
PPT	Proteína plasmática total
RBC	Hemácias
RDW	Tamanho dos eritrócitos
SRAT	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2 OBJETIVOS	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Animais	18
3.2 Drogas	18
3.3 Grupos Experimentais	19
3.4 Indução da PA	19
3.5 Coleta Sanguínea	20
3.6 Eutanásia e Processamento Laboratorial	20
4 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	22
4.1 Análise Sanguínea	22
4.1.1 Hemograma	22
4.1.2 Estresse Oxidativo	23
4.2 Análise Histológica	23
4.3 Análise Microtomográfica	24
4.4 Análise Estatística	24
5 RESULTADOS	26
5.1 Análise Sanguínea	26
5.1.1 Hemograma	26
5.1.2 Estresse Oxidativo	30
5.2 Análise Histológica	32
5.3 Análise Microtomográfica	33
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	47

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A periodontite apical (PA) representa a resposta do organismo a uma infecção bacteriana, resultando de um processo dinâmico no qual os canais radiculares são contaminados por diferentes microrganismos. Estes microrganismos, por meio de seus subprodutos, desencadeiam uma resposta inflamatória e, subsequentemente, a destruição dos tecidos periapicais (Nair, 2004; Sundqvist; Figdor, 2003). A persistência do processo infeccioso, muitas vezes devido à dificuldade na eliminação do agente etiológico e à resposta imunológica deficiente, leva à destruição óssea periapical. Na análise histopatológica, é observada a presença de tecido fibroso, granulação e infiltrado celular inflamatório (Gazivoda *et al.*, 2009).

A PA é uma condição de elevada prevalência na população em geral (Jakovljevic *et al.*, 2020). Aproximadamente 52% da população adulta em todo o mundo apresenta pelo menos um dente com PA (Tibúrcio-Machado *et al.*, 2021). Além disso, dados indicam que, em média, os brasileiros possuem 2,7 dentes afetados por PA por pessoa (Marotta *et al.*, 2012), o que amplia o potencial de influenciar a saúde sistêmica (Cintra *et al.*, 2021).

Diferentes tipos de células e componentes celulares desempenham papéis cruciais na resposta do organismo à infecção periapical (Liapatas *et al.*, 2003). Os leucócitos, por exemplo, têm a função de induzir a produção de citocinas e quimiocinas, resultando no aumento da resposta inflamatória (Bian *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2007). Entre os leucócitos, destacam-se os macrófagos, linfócitos T e B, e células apresentadoras de antígeno, todos essenciais na manutenção do processo inflamatório (Márton; Kiss, 2000). No contexto específico dos linfócitos, que são subdivididos em linfócitos do tipo T e B, desempenham funções distintas. Os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos, enquanto os linfócitos T induzem a morte celular, regulam a atividade de outras células, como macrófagos e linfócitos B, além de produzirem citocinas endógenas e ativarem citocinas extracelulares (Wik; Skålhegg, 2022).

A literatura também relata que as células Tregs e T auxiliares derivadas dos linfócitos T CD4+ em conjunto com as citocinas pró-inflamatórias estão relacionadas à destruição óssea e progressão da lesão periapical (Colić *et al.*, 2009; Fukada *et al.*, 2009). As citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias são produzidas pelos

linfócitos T auxiliares (Kawashima; Stashenko, 1999), sendo o TNF-a, IL-1, IL-6, IL-10, IL-17, IL-23, comuns no processo inflamatório periapical (Cintra *et al.*, 2021; Martinho *et al.*, 2012). Já durante a osteoclastogênese, citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 beta e TNF-a possuem papel de destaque (Fouad *et al.*, 2020; Jakovljevic *et al.*, 2015).

As alterações provocadas localmente pela PA apresentam potencial de repercutir sistemicamente (Cintra *et al.*, 2021), e desta maneira estas alterações não aforam ainda estudadas ao longo do tempo de desenvolvimento da PA. Fato que nos motivou a realização deste estudo.

Os exames sanguíneos apresentam capacidade de identificar alterações sistemicamente (Cintra *et al.*, 2014b). Estes exames possibilitam a avaliação de diferentes elementos celulares presentes no sangue, podendo colaborar no diagnóstico de enfermidades, na identificação da capacidade de resposta do indivíduo à uma infecção, ou ainda, analisar os efeitos de um tratamento local e/ou sistêmico (Gkrania-Klotsas *et al.*, 2010; Malandrino *et al.*, 2012; Odagiri *et al.*, 2011).

Outro mecanismo relacionado a destruição óssea e consequente progressão da lesão periapical é a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo que desequilíbrios no estado redox podem resultar em destruição tecidual (Barcelos *et al.*, 2020; Prieto *et al.*, 2017). O estresse oxidativo é um processo decorrente do desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes, sendo caracterizado pela produção excessiva de EROs ou pela eliminação desses, que resulta na oxidação de biomoléculas e, consequentemente, perda das funções biológicas (Barbosa *et al.*, 2010). Esse desequilíbrio pode levar a danos celulares em ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, além de distúrbios do metabolismo celular (Maciejczyk *et al.*, 2017). A ausência de equilíbrio entre a produção e a eliminação das espécies reativas de oxigênio podem ser analisadas por meio dos biomarcadores sanguíneos do estado redox, dentre eles, a capacidade antioxidante total (CAT) e a concentração de oxidante total (COT) (Hernández-Ríos *et al.*, 2017).

A capacidade antioxidante representa um dos mecanismos pelos quais o organismo pode resguardar-se dos radicais livres, prevenindo ou inibindo as reações oxidativas que afetam as biomoléculas (Erel, 2004). No contexto da PA, as espécies reativas de oxigênio são produzidas como resultado das mudanças nos tecidos de

suporte dos dentes ocasionadas pelo processo inflamatório (Georgiou *et al.*, 2021). O aumento do COT e a redução da CAT são comuns na PA (Hernández-Ríos *et al.*, 2017). Além disso, um estudo clínico demonstrou que pacientes com PA crônica apresentaram um aumento do COT e redução da CAT, podendo evidenciar uma correlação positiva entre a PA e o estresse oxidativo (Inchingolo *et al.*, 2013). Por outro lado, a literatura é carente de informações a respeito das modificações destes agentes ao longo do desenvolvimento da PA.

Outro aspecto importante relacionado ao estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, que pode ser verificada por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT), que em altas concentrações, pode indicar a presença de danos celulares (Frazão *et al.*, 2023). Por outro lado, não se sabe sobre as possíveis alterações na peroxidação lipídica em função do desenvolvimento da PA.

Apesar de alguns estudos terem avaliado a relação entre a PA e a inflamação sistêmica (Cintra *et al.*, 2014a, 2016, 2021; Samuel *et al.*, 2019), há necessidade de maior conhecimento quanto a influência da PA nas alterações sistêmicas durante o seu desenvolvimento. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a relação do desenvolvimento da PA com as possíveis alterações em diferentes parâmetros sanguíneos, alterações histopatológicas e sua progressão volumétrica.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi analisar a influência do desenvolvimento e progressão da PA sobre parâmetros sanguíneos, histológicos e microtomográfico.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Analisar a influência do desenvolvimento e progressão da PA nos parâmetros sanguíneos (hemograma completo e estresse oxidativo).
- Analisar o perfil do infiltrado inflamatório por meio da análise histológica durante o desenvolvimento e progressão da PA;
- Analisar a progressão da reabsorção óssea por meio da análise microtomográfica durante o desenvolvimento e progressão da PA.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

Os procedimentos experimentais propostos neste estudo foram aprovados na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/Unesp) no. 265-2024. Foram utilizados 32 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 250 gramas, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Foram mantidos quatro animais por isolador (Alesco - Albr Industria e Comercio Ltda., Monte Mor, SP, Brasil) com a temperatura entre 22 e 24°C com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados durante todo período experimental com dieta sólida e água “*ad libitum*”, com exceção nas 12 horas que antecederam o procedimento cirúrgico para indução da PA e 6 horas após o procedimento. Antes de iniciar os experimentos, os animais ficaram em isolamento durante 7 dias para adaptação ao novo habitat e para contenção de alguma possível doença de fácil propagação.

3.2 Drogas

Os animais foram vermifugados com Ivermectina 1% via oral (Revectina, Abbott - Lab do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Foram dissolvidos 0,3 ml da droga para cada litro de água, administrado “*ad libitum*” durante 1 semana antes do início do experimento.

O protocolo anestésico utilizado para os procedimentos experimentais foi à base de Xilazina 2% (Xilazin, Syntec do Brasil Ltda., Cotia, SP, Brasil) na dosagem de 10mg por Kg, associado ao Cloridrato de Cetamina 10% (Ketamina, Agener - União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil) na dosagem de 80mg por Kg, via intramuscular.

Para realização da eutanásia, os animais foram anestesiados conforme o protocolo descrito e em seguida foi administrado Tiopental sódico (THIopentax, Cristália - SP, Brasil) na dosagem de 150 mg por kg, via intraperitoneal.

3.3 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos de 8 animais, de acordo com a variável a ser analisada.

Grupo Controle: animais em que a PA não foi induzida;

Grupo PA7: animais em que a PA foi induzida e as análises realizadas após 7 dias;

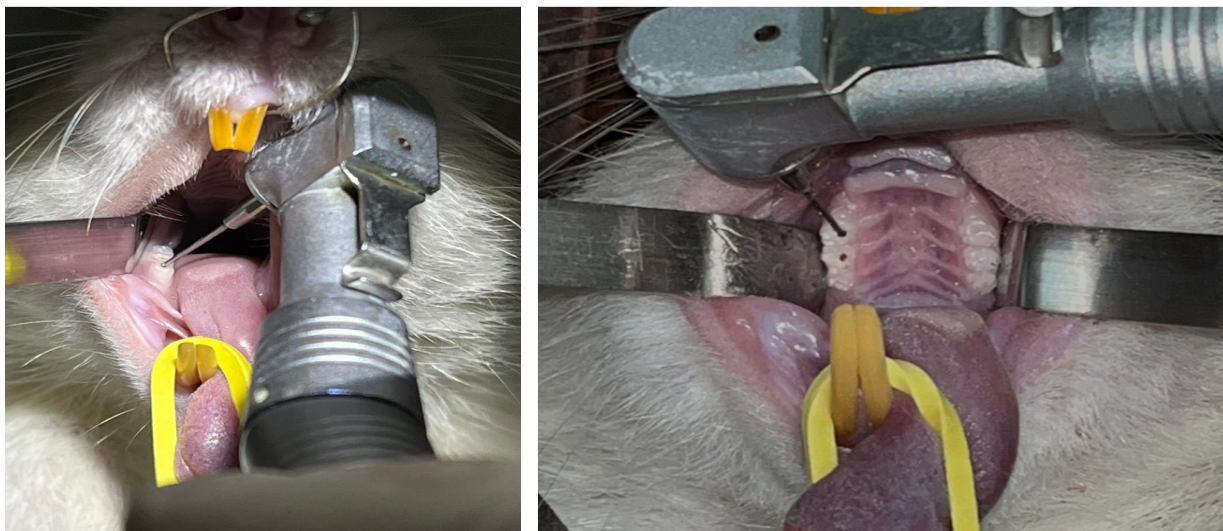
Grupo PA14: animais em que a PA foi induzida e as análises realizadas após 14 dias;

Grupo PA28: animais em que a PA foi induzida e as análises realizadas após 28 dias.

3.4 Indução da PA

Os animais foram anestesiados utilizando o protocolo descrito anteriormente e a PA foi induzida por meio da exposição pulpar dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito empregando uma broca de aço carbono (Broca Ln CA 28mm, Long Neck, Maillefer, Dentsply, Tulsa, Ok, USA) dotada de uma esfera na extremidade com 0,5mm de diâmetro de acordo com Cintra *et al.* (2016) (Figura 1).

Figura 1 - Procedimento de exposição pulpar dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores empregando broca de aço carbono em baixa rotação para indução da PA



Fonte: Autor, 2024

3.5 Coleta sanguínea

Após os períodos experimentais de 7, 14 ou 28 dias, conforme o grupo experimental, os animais foram anestesiados e o sangue foi coletado por punção cardíaca para as análises de Hemograma completo e estresse oxidativo para CAT, COT e SRAT.

3.6 Eutanásia e processamento laboratorial

Após coleta sanguínea os animais foram eutanasiados conforme protocolo bdescrito anteriormente. Em seguida, as maxilas e mandíbulas foram imediatamente dissecadas e fixadas em solução de formalina tamponada neutra durante 18 horas (Cintra *et al.*, 2016). Após fixação, as mandíbulas foram armazenadas em álcool 70% para posterior escaneamento em microtomógrafo (Cintra *et al.*, 2014a). Já as maxilas foram lavadas por 12 horas em água corrente e desmineralizadas em ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) a 10% e, finalmente lavadas por 24 horas em água corrente. Posteriormente foram desidratadas em álcool (Labsynth Produtos

para Laboratórios Ltda., Diadema, SP Brasil), diafanizadas em xilol (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, SP Brasil) e incluídas em parafina (Histosec, Merck S/A, São Paulo, SP, Brasil).

Os blocos foram cortados em micrótomo (RM 2045, Leica do Brasil Importação e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil), com espessura de 3 μ m e os cortes teciduais foram obtidos. Foram montadas 2 lâminas starfrost (Knittel Glasbearbeitungs, Braunschweig, Germany) com três cortes teciduais para cada espécime e foram coradas com Hematoxilina e Eosina.

4 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1 Análise sanguínea

4.1.1 Hemograma

As amostras sanguíneas foram colocadas em EDTA, centrifugadas e armazenadas imediatamente a -20°C . Foram observados os seguintes parâmetros do Eritrograma: Hemácias ($\times 10^9/\mu\text{L}$), Hemoglobina (g/dL), Hematócrito (%), Volume corpuscular médio (fL), Concentração de hemoglobina corpuscular média (%), Tamanho do eritrócito (%), Contagem de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e Proteína plasmática total (g/dL). Foram observados os seguintes parâmetros do Leucograma: Leucócitos (células/ μL), Neutrófilos (células/ μL), Linfócitos (células/ μL), Eosinófilos (células/ μL), Bastonetes (células/ μL) e Monócitos (células/ μL).

Para a realização do exame, foi utilizado o aparelho ABX Vet (ABX Diagnostics) e o ABX VetPack composto por 3 reagentes. O ABX VET Pack, R3 é uma solução salina e tampão eletrolítica que permite a diluição e a preparação da amostra de sangue para análise. A presença de surfactante não iônico garante a dinâmica do fluxo em todos os sistemas hidráulicos do instrumento. A ação eletrolítica aceita a contagem das células por impedância. Este reagente também diferencia populações morfológicas de leucócitos. Também é utilizado nos ciclos de enxágue e limpeza dos sistemas hidráulicos do instrumento.

O ABX VET Pack, R2 decompõe a membrana celular dos eritrócitos. Pela adição do agente surfactante, a hemoglobina é libertada. Todo o ferro heme é oxidado e os complexos resultantes são quantificados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 530nm. O detergente presente na solução também diferencia populações morfológicas de leucócitos. ABX VET Pack, R1 utiliza a ação combinada de uma enzima proteolítica com um detergente para eliminar os resíduos de proteína e evitar que os tubos hidráulicos fiquem obstruídos e/ou bloqueiem o fluxo. Também é usado para decompor os acúmulos de proteína nas aberturas e câmaras de contagem.

O volume globular foi analisado pelo método de microhematócrito e a contagem diferencial de leucócitos e análise morfológica de hemácias e leucócitos em esfregaços sanguíneos corados pelo corante Panótico rápido.

4.1.2 Estresse Oxidativo

A CAT foi realizada através do ensaio de FRAP (Brasilino *et al.*, 2018). Onde se mede a capacidade de redução férrica do plasma, que oferece um índice do potencial antioxidante, ou redutor, de fluidos biológicos. A redução de íon férrico em íon ferroso em pH baixo causa a formação de um complexo colorido ferrosotripiridiltriazina, onde são medidos através da comparação e mudanças de absorvância em 593 nm resultando em uma curva padrão (Brasilino *et al.*, 2018). A COT foi determinada pelo método Xylenol Orange. SRAT foi realizada através da quantificação de MDA pelo método de Hunter modificado, com auxílio de uma leitora automática de microplacas de 96 poços e absorvância 545 nm (Prieto *et al.*, 2017). O MDA é um dialdeído formado pela clivagem beta dos ácidos graxos poliinsaturados peroxidados durante a lipoperoxidação, a sua determinação é umas das técnicas de avaliação de oxidação lipídica mais frequentemente utilizada. Em meio ácido e aquecido o MDA reage com compostos nucleofílicos como ácido tiobarbitúrico possibilitando sua aferição.

4.2 Análise Histológica

A análise histológica foi realizada para caracterizar o perfil do infiltrado inflamatório das lesões periapicais (Cintra *et al.*, 2014b). Foram realizadas duas, uma descritiva e outra qualitativa. As lâminas com os cortes de cada espécime foram analisadas por microscopia óptica e utilizadas para a análise descritiva, que foi a descrição dos fenômenos histopatológicos e suas características.

A análise qualitativa foi realizada por meio da atribuição de escores para o critério de severidade do infiltrado inflamatório, de acordo com Cintra *et al.* (2014a). A classificação por meio de escore foi baseada no número médio aproximado de células inflamatórias presentes em diferentes campos de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400X junto à região periapical.

Escore 1: Células inflamatórias ausentes ou em número desprezível;2

Escore 2: Infiltrado inflamatório discreto (menos de 25 células por campo);

Escore 3: Infiltrado inflamatório moderado (de 25 a 125 células por campo);

Escore 4: Infiltrado Inflamatório Intenso (mais 125 células por campo).

4.3 Análise microtomográfica

A progressão da reabsorção óssea foi realizada de acordo com Cosme-Silva *et al.* (2020) e Justo *et al.* (2022). As mandíbulas foram digitalizadas usando o sistema μ CT (Bruker SkyScan 1272, Aartselaar, Bélgica). Cada amostra foi colocada em um frasco e posicionada com o incisivo voltado para cima e posteriormente foram estabelecidas as seguintes configurações: 70 kV, 167 μ A, ao passo de rotação de 0,5° e à exposição de 2100 milissegundos. Após escaneamento de cada amostra, foi realizada a reconstrução com uso do software NRecon (Skyscan, Bélgica). Foi utilizado o software DATA VIEWER v. 1.5.1.2 onde os planos foram ajustados para melhor compreensão da área da lesão. A área de interesse foi a região apical dos primeiros e segundos molares mandibulares do lado direito. A área de interesse para análise da reabsorção óssea periapical começou no primeiro corte transaxial, onde o molar estava completamente encapsulado pelo osso da crista óssea e continuou em direção ao ápice da raiz, terminando no último corte em que a reabsorção óssea foi visualizada.

4.4 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa SigmaPlot 12.0™ (Chicago, IL, USA). A verificação da normalidade dos dados foi realizada através dos testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. As variáveis que apresentavam valor normal foram expressas em média e desvio padrão e aquelas que apresentavam distribuição não normal foram expressas em mediana com valor mínimo e máximo de percentis.

Para os valores quantitativos das análises que seguem distribuição normal foi aplicado o teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey.

Para as análises sem distribuição normal, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a

probabilidade for menor que 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análise sanguínea

5.1.1 Hemograma

Os resultados do eritrograma estão apresentados nas tabelas 1 e gráfico 1. A análise sanguínea da série vermelha revelou redução do número de Hemácias e Hemoglobina no grupo PA7 comparado aos demais grupos ($p < 0,05$); aumento do Volume corpuscular médio em todos os grupos com PA em relação ao controle ($p < 0,05$), sendo o maior volume no grupo PA7 com diferença para os grupos PA14 e PA28 ($p < 0,05$); redução da Concentração de hemoglobina corpuscular média no grupo PA7 em relação aos demais grupos ($p < 0,05$); e redução da Largura da distribuição das células vermelhas no grupo PA14 em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Não houve diferença para hematócrito, contagem de Plaquetas e Proteína plasmática total entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 1 - Média/Mediana e Desvio Padrão/Desvio Interquartilico dos eritrócitos no sangue

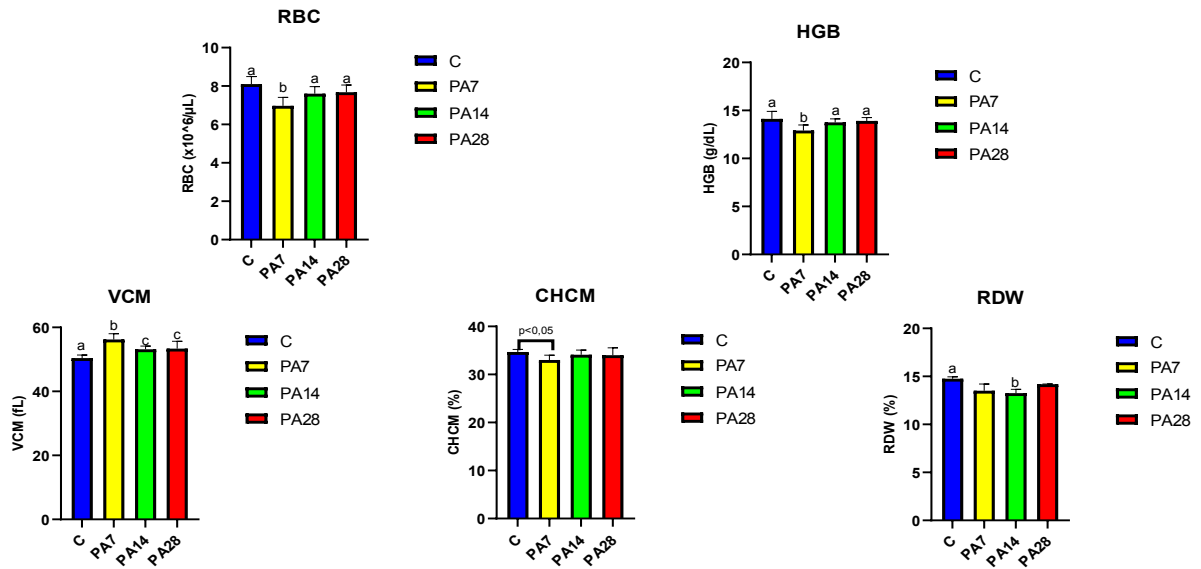
Eritograma	Grupos (Média/Mediana ± Desvio Padrão/Intervalo Interquartilico)*			
	C	PA 7	PA 14	PA 28
Hemácias (RBC) (x10 ⁶ /μL)	8,100 (±0,395) ^a	6,969 (±0,441) ^b	7,600 (±0,370) ^a	7,680 (±0,376) ^a
Hemoglobina (HGB) (g/dL)	14,129 (±0,778) ^a	12,914 (±0,579) ^b	13,762 (±0,362) ^a	13,914 (±0,352) ^a
Hematocrito (%)	40,750 (±2,053)	39,142 (±2,356)	40,375 (±1,506)	41,000 (±2,619)
VCM (fL)	50,449 (±0,916) ^a	56,209 (±1,818) ^b	53,155 (±1,032) ^c	53,390 (±2,266) ^c
CHCM (%)	34,667 (±0,546) ^a	33,030 (±1,002) ^b	34,109 (±0,964) ^b	34,030 (±1,504) ^b
RDW (%)	14,750 (14,452-14,950) ^a	13,500 (13,175-14,203) ^{ab}	13,250 (12,925-13,650) ^b	14,185 (13,525-14,200) ^{ab}
PLT (x10 ⁴ /μL)	387,125 (±61,809)	385,625 (±44,356)	360,000 (±78,376)	440,000 (±40,000)
PPT (g/dL)	7,200 (±0,338)	7,543 (±0,206)	7,425 (±0,433)	7,514 (±0,368)

*Letras diferentes, indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

(VCM – Volume corpuscular médio; CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW- *Red cell distribution width* (distribuição da largura de célula vermelhas); PLT- *Platelet count blood test* (teste de contagem de plaquetas); PPT- Proteínas plasmáticas totais).

Fonte:Autor, 2024

Gráfico 1 - Valores obtidos do eritograma nos diferentes grupos experimentais



Fonte: Autor, 2024

Os resultados do leucograma estão apresentados nas tabelas 2 e gráfico 2. A análise sanguínea da série branca revelou aumento de leucócitos, neutrófilos e linfócitos em todos os grupos com PA em relação ao controle ($p < 0,05$). Não houve diferença para Eosinófilo, Bastonetes e Monócito entre os grupos ($p > 0,05$).

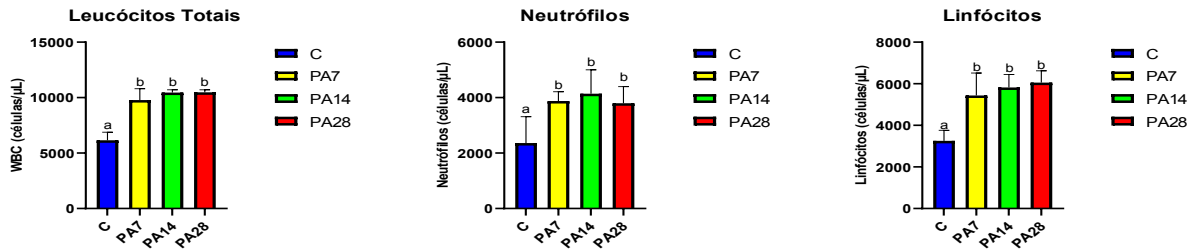
Tabela 2 - Média/Mediana e Desvio Padrão/Desvio Interquartílico dos leucócitos no sangue

Leucograma	Grupos (Média/Mediana ± Desvio Padrão/Intervalo Interquartílico)*			
	C	PA 7	PA 14	PA 28
Leucócitos Totais (x10²/μL)	61,50 (45,25-68,75) ^a	97,85 (83,50-108,00) ^b	104,50 (101,25-107,00) ^b	104,78 (101,50-107,00) ^b
Linfócitos (x10²/μL)	32,59 ± 5,07 ^a	54,37 ± 10,79 ^b	58,25 ± 6,15 ^b	60,59 ± 5,66 ^b
Neutrófilos (x10²/μL)	23,63 ± 9,48 ^a	38,76 ± 3,34 ^b	41,40 ± 8,62 ^b	37,99 ± 5,97 ^b
Monócitos (x10²/μL)	1,46 ± 0,76	2,36 ± 1,07	2,19 ± 1,42	2,73 ± 1,56
Bastonetes (x10²/μL)	0,12 (0,00-0,59)	0,19 (0,000-0,88)	0,00 (0,00-0,77)	0,21 (0,00-1,00)
Eosinófilos (x10²/μL)	0,00 (0,00-1,28)	0,79 (0,00-1,57)	1,06 (1,01-1,50)	1,51 (1,01-3,20)

*Letras diferentes, indicam diferença estatística entre os grupos (p<0,05).

Fonte: Autor, 2024

Gráfico 2 - Valores obtidos do WBC, neutrófilos e linfócitos nos diferentes grupos experimentais



Fonte: Autor, 2024

5.1.2 Estresse Oxidativo

Os resultados relacionados ao estresse oxidativo estão descritos na tabela 3 e no gráfico 3.

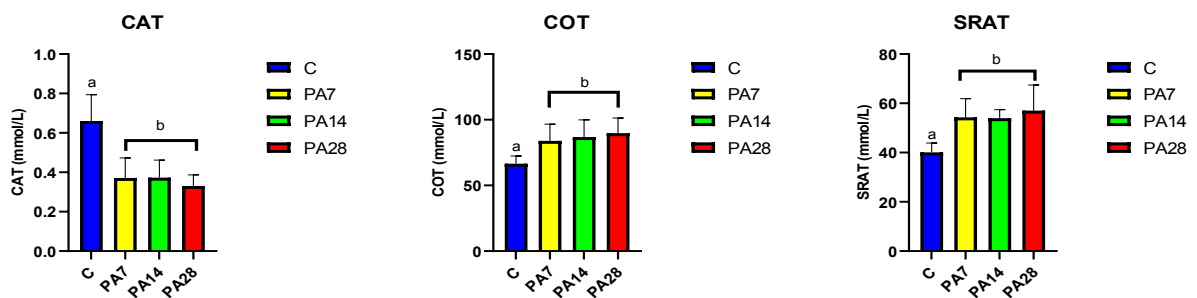
Todas as análises referentes ao estresse oxidativo (CAT, COT e SRAT) indicaram diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo controle e os diferentes períodos após a indução da PA, havendo redução do CAT e aumento do COT e SRAT nos grupos com PA. Não houve diferença estatística entre os períodos de 7, 14 e 28 dias ($p > 0,05$).

Tabela 3 - Média/Mediana e Desvio Padrão/Desvio Interquartilício do Estresse Oxidativo no sangue

Estresse Oxidativo	Grupos (Média/Mediana ± Desvio Padrão/Intervalo Interquartilício)*			
	C	PA7	PA14	PA28
CAT (mmol/L)	0,66 ± 0,13 ^a	0,37 ± 0,10 ^b	0,37 ± 0,09 ^b	0,33 ± 0,06 ^b
COT (mmol/L)	66,61 (59,96-72,40) ^a	83,98 (77,03-96,71) ^b	86,87 (78,48-99,89) ^b	89,77 (80,51-101,34) ^b
SRAT (mmol/L)	40,09 (37,32-43,90) ^a	54,29 (52,21-61,90) ^b	53,94 (50,30-57,40) ^b	57,06 (50,82-67,44) ^b

*Letras diferentes, indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).
Fonte: Autor, 2024

Gráfico 3 - Valores obtidos do estresse oxidativo nos diferentes grupos experimentais



Fonte: Autor, 2024

5.2 Análise Histológica

Os resultados da análise histológica estão apresentados por meio de fotomicrografias representativas na figura 2 e de dados qualitativos na tabela 4.

O grupo controle apresentou aspectos de normalidade e homeostasia tecidual tanto nos tecidos pulpaes como periapicais. Por outro lado, todos os grupos com PA apresentaram infiltrado inflamatório de diferentes severidades em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

O grupo PA7 apresentou infiltrado inflamatório de predominância discreta, já o grupo PA14 um infiltrado de predominância moderada, enquanto o PA28 a predominância foi severa. Após análise estatística pode-se observar que os grupos PA14 e PA28 apresentaram diferenças em relação ao PA7 ($p < 0,05$), mas sem diferenças entre si ($p > 0,05$).

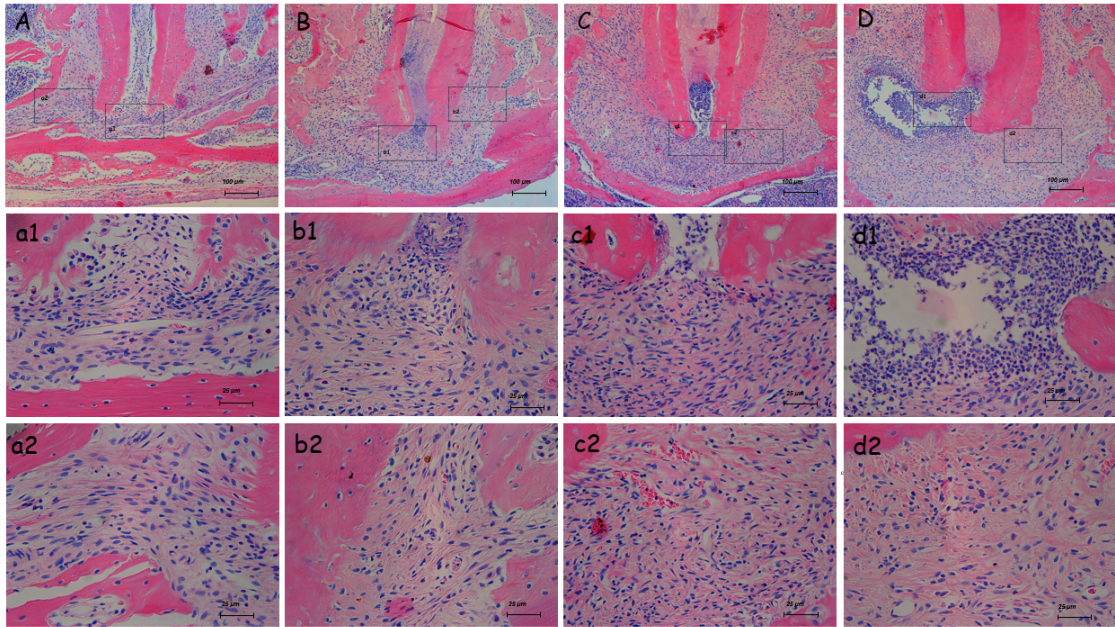
Tabela 4 - Escores e mediana de intensidade de células inflamatórias

	Escores	Grupos				Valor de P
		C	PA7	PA14	PA28	
Intensidade do Infiltrado Inflamatório	1	8/8	0/8	0/8	0/8	p < 0.001
	2	0/8	6/8	0/8	0/8	
	3	0/8	2/8	5/8	2/8	
	4	0/8	0/8	3/8	6/8	
	Mediana*	1 ^a	2 ^b	3 ^c	4 ^c	
Reabsorção óssea peripapical (mm³)*		0,22 ± 0,04 ^a	± 0,55 ± 0,14 ^b	± 0,89 ± 0,20 ^c	± 1,96 ± 0,19 ^d	± p < 0.001

* Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas nas linhas ($P < .05$).

Fonte: Autor, 2024

Figura 2 - Imagem dos cortes histológicos em He em diferentes aumentos (100X e 400X). A - Grupo Controle; B - Grupo PA 7 dias; C - Grupo PA 14 dias; D - Grupo PA 28 dias

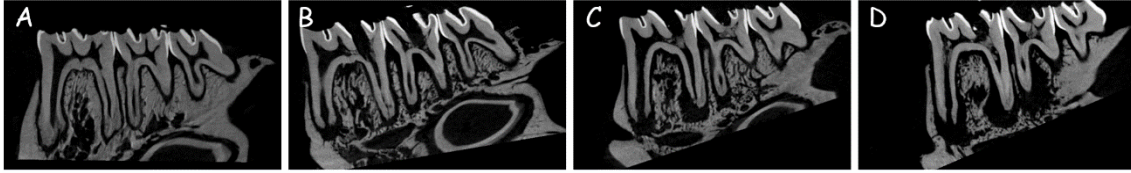


Fonte: Autor, 2024

5.3 Análise Microtomográfica

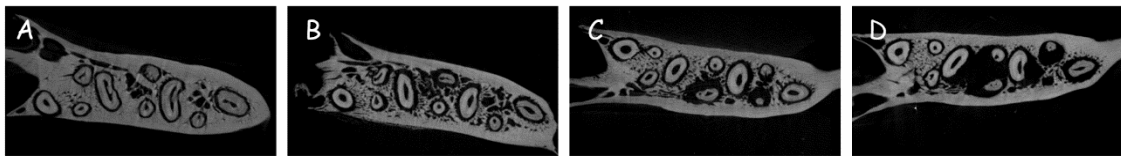
Os resultados da análise microtomográfica estão apresentados por meio de fotomicrotomografias representativas na figura 3 e de dados quantitativos na tabela 4. A análise microtomográfica revelou aumento significativo na reabsorção óssea entre todos os tempos de desenvolvimento da PA ($p < 0,05$). Ou seja, o grupo PA7 apresentou maior reabsorção óssea comparado ao controle ($p < 0,05$); o grupo PA14 apresentou maior reabsorção óssea comparado ao PA7 ($p < 0,05$); e o grupo PA28 apresentou maior reabsorção óssea comparado ao PA14 ($p < 0,05$);

Figura 3 - Imagem coronal de microtomografia dos dentes com periodontite apical nos diferentes períodos analisados: A - controle, B - PA7 dias, C - PA14 dias, D – PA 28 dias



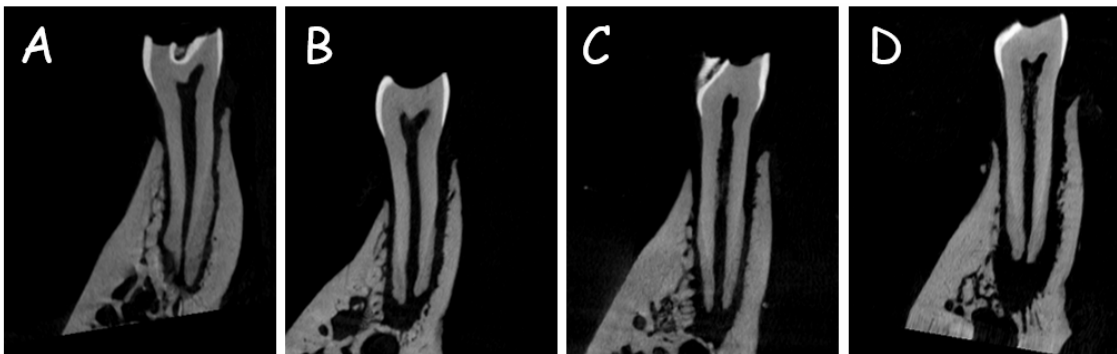
Fonte: Autor, 2024

Figura 4 – Imagem transaxial de microtomografia dos dentes com periodontite apical nos diferentes períodos analisados: A - controle, B - PA7 dias, C - PA14 dias, D – PA 28 dias



Fonte: Autor, 2024

Figura 5 – Imagem sagital de microtomografia dos dentes com periodontite apical nos diferentes períodos analisados: A - controle, B - PA7 dias, C - PA14 dias, D – PA 28 dias



Fonte: Autor, 2024

6 DISCUSSÃO

O potencial da PA influenciar a condição sistêmica tem encorajado estudos em decorrência da importância e das consequências ao organismo (Cintra *et al.*, 2021). Neste sentido, procurou-se analisar a influência do desenvolvimento e progressão da PA sobre parâmetros sanguíneos, histológicos e microtomográficos.

As metodologias desenvolvidas no presente experimento constituem modelos experimentais padrões e de rotina no laboratório de pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP), sendo utilizadas em várias investigações previamente publicados (Cintra *et al.*, 2016; Cosme-Silva *et al.*, 2020; Justo *et al.*, 2022; Prieto *et al.*, 2017).

Os eventos inflamatórios periapicais se desenvolvem como consequência da infecção bacteriana, são complexos e consistem em diversos elementos. Respostas imediatas, incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de leucócitos são mediadas por mediadores endógenos, como prostaglandinas, bradicininas e neuropeptídeos Stashenko, Teles e D'Souza (1998).

Durante o desenvolvimento da PA pode-se verificar alterações significativas em diferentes parâmetros sanguíneos, alterações histopatológicas e sua progressão volumétrica com destruição de osso na região periapical (Cintra *et al.*, 2016; Gazivoda *et al.*, 2009). Os valores observados com o eritrograma podem ser úteis ao avaliar a resposta do organismo ao processo de infecção que avança na região periapical (Malandrino *et al.*, 2012). Este exame fornece informações sobre os glóbulos vermelhos do sangue (eritrócitos ou hemácias) capazes de determinar a quantidade, tamanho e forma destas células (Klinken *et al.*, 2002). Estes glóbulos brancos e vermelhos podem desempenhar um papel importante na avaliação de processos infecciosos, como a detecção de uma inflamação periapical e sua correlação sistêmica a partir do aumento na contagem destas células, como resposta frequente do sistema imunológico às infecções (Frottier; Modaï, 1975).

Nesse sentido, Samuel *et al.* (2018) analisaram a influência de múltiplas periodontites apicais (PAs) sobre a contagem de células sanguíneas e citocinas. Nas análises realizadas, aos 30 dias, não foi observado diferença estatística nos níveis de hemoglobina e no hematócrito, ao comparar o grupo com 4 PAs e o controle. Estes resultados são semelhantes aos obtidos no presente estudo no mesmo

período analisado. Além disso, a concentração de linfócitos e neutrófilos estava aumentada aos 30 dias em relação ao controle, resultados estes, também semelhantes ao obtido no presente estudo no período de 28 dias.

Neste mesmo contexto, em que a PA afeta sistemicamente o organismo humano, Sathyanarayanan *et al.* (2023) observaram que a presença da PA e a ausência de tratamento endodôntico estão diretamente relacionadas ao aumento da contagem leucocitária, de linfócitos e de eosinófilos na corrente sanguínea. No presente estudo foi determinado que houve diferenças estatisticamente significativas em vários parâmetros sanguíneos ao longo do período de observação (7, 14 e 28 dias). Os valores do eritrograma indicaram importantes informações frente ao desenvolvimento da PA.

A PA pode ser responsável por uma anemia em decorrência da liberação de citocinas inflamatórias que afetam a produção de glóbulos vermelhos na medula óssea. Em condições mais graves de PAs associadas a disseminação da infecção para outras regiões, o eritrograma pode auxiliar na detecção de complicações em uma sepse ou inflamação generalizada (Failace; Fernandes, 2015; Greer *et al.*, 2019; Knoll; Rowell, 1996).

Na concentração de hemácias e hemoglobina, o presente estudo mostrou diminuição em suas concentrações, sendo observada diferença entre o período de 7 dias e os demais períodos. Este fato pode indicar a presença de uma anemia em decorrência do processo infeccioso, em que o organismo redistribui o ferro para locais de armazenamento, relacionados ao sistema fagocitário mononuclear (Chaparro, Suchdev, 2019; Nairz *et al.*, 2016; Weiss, 2005). O VCM (Volume Corpuscular Médio) aumentou ao se comparar o grupo controle com os períodos experimentais, e o grupo de 7 dias com os períodos de 14 e 28 dias, sendo o pico de aumento observado no período de 7 dias. Este aspecto também pode indicar a presença de anemia, possivelmente relacionada às infecções (Nairz *et al.*, 2016). A CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) no presente estudo indicou valores superiores no grupo controle em relação aos outros, o que também seria um indicativo de anemia infecciosa.

Os valores de RDW (Largura de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos) mostraram diferença entre o grupo controle e o período de 14 dias com uma

diminuição dos demais grupos em relação ao grupo controle. Isoladamente não indica nada necessariamente, mas ao se relacionar esses dados com os anteriores observa-se a presença de anemia infecciosa. Os resultados de hematócrito, PLT (Plaquetas) e PPT (Plaquetócrito) mostraram que não foram observadas diferenças entre os grupos em relação a esses parâmetros. Estes dados sugerem uma estabilidade desses parâmetros ao longo do período de observação. Dessa forma, observou-se que a indução de PA em quatro molares influenciou a nível sistêmico, havendo indícios de presença de anemia infecciosa, especialmente no período de 7 dias.

Respostas imunes não específicas, incluindo migração e ativação de leucócitos polimorfonucleares e monócitos, bem como produção de citocinas, são desencadeadas em resposta a bactérias e seus produtos. A inflamação periapical crônica envolve ainda respostas antibacterianas específicas mediadas por células T e B, que ativam uma rede de citocinas reguladoras produzidas por linfócitos T do tipo Th1 e Th2. As respostas específicas e não específicas interagem e são reguladas pelo sistema imunológico. Como modelo experimental, o modelo de indução de lesão periapical apresenta vantagens que a permitem ser usada em estudos de ecologia e patogênese microbiana, resposta do hospedeiro, neuroimunologia e reabsorção e regeneração óssea. Bian *et al.* (2012) discutiram a regulação da resposta inflamatória e destacaram a importância da infiltração de neutrófilos (PMN) na inflamação e sua contribuição para danos nos tecidos. A resposta e a infiltração de PMN são significativamente aumentadas em camundongos com inflamação sistêmica. Cintra *et al.* (2021) analisaram a inter-relação entre condições patológicas sistêmicas e periapicais. As mudanças sistêmicas podem potencializar a patogênese da infecção endodôntica, capaz de favorecer seu desenvolvimento e progressão.

Os resultados do presente estudo refletem uma resposta inflamatória e imunológica aumentada nos grupos experimentais em comparação com o grupo controle, evidenciada pelo aumento das contagens de leucócitos totais, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos. Assim, verifica-se uma possível resposta do sistema imunológico a um estímulo ou condição específica presente nos grupos experimentais.

A PA é uma condição inflamatória que resulta no aumento do estresse oxidativo e na produção elevada de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio na área afetada pela infecção (Cintra *et al.*, 2016). Durante a resposta imunológica, células como os leucócitos podem gerar radicais livres como parte do processo de combate às bactérias invasoras. No entanto, se a produção de radicais livres não for devidamente regulada pelos mecanismos antioxidantes do corpo, pode ocorrer um acúmulo excessivo dessas substâncias, levando ao estresse oxidativo. Esse fenômeno pode resultar em danos aos tecidos periodontais, exacerbando a inflamação e contribuindo para a progressão da PA. Além disso, o estresse oxidativo pode desempenhar um papel na degradação do colágeno e na perda óssea associada à periodontite (Chapple; Milward; Dietrich, 2007; Halliwell; Gutteridge, 2007; Prieto *et al.*, 2017).

No presente estudo foi determinado o estresse oxidativo (CAT, COT e SRAT) em ratos wistar com PA desenvolvida em períodos de 7, 14 e 28 dias. Todas as análises referentes ao estresse oxidativo indicaram diferença estatística entre o grupo controle e os diferentes períodos após a indução da PA.

O estresse oxidativo observado ao se induzir PAs em 2 dentes em animais de 90 dias de idade foi analisado aos 14 e 28 dias por meio da peroxidação lipídica, capacidade antioxidante equivalente ao Trolox e redução de glutathiona (Frazão *et al.*, 2023). Em todas as análises foi verificado um aumento nas concentrações, indicando a presença do estresse oxidativo. A peroxidação lipídica foi maior aos 28 dias em comparação aos 14 dias e ao grupo controle, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo, que observou o estresse oxidativo sistêmico relacionado a indução de 4 PAs em animais de 60 dias, indicando e reforçando, portanto, o desequilíbrio no estado redox e a resposta antioxidante diminuída.

A influência do estresse oxidativo na resposta inflamatória hepática decorrente da periodontite apical foi analisada por Xiao *et al.* (2023). O estudo avaliou a CAT e o COT. Foi observado um aumento na concentração oxidante total e diminuição na capacidade antioxidante total nos animais com a doença periapical. O presente estudo mostrou diminuição sérica da CAT e aumento da COT, semelhante a Xiao *et al.* (2023), que no período de 5 semanas observaram que os animais, que apresentavam 2 dentes com PA, obtiveram uma diminuição nos

parâmetros da CAT e um aumento da COT, reforçando, portanto, o potencial prejudicial sistêmico do desenvolvimento e manutenção da PA.

Em relação ao perfil do infiltrado inflamatório das lesões periapicais, o presente estudo demonstrou aumento no infiltrado inflamatório diretamente proporcional ao tempo de indução da lesão, com diferença entre o grupo controle e os diferentes tempos experimentais. Ainda, os períodos de 14 e 28 dias apresentaram maior inflamação em relação ao período de 7 dias, entretanto, sem diferença entre si.

De forma similar foi observado em diversos estudos o potencial inflamatório local relacionado a PA (Cantiga-Silva *et al.*, 2021; Cintra *et al.*, 2014b; Frazão *et al.*, 2023; Samuel *et al.*, 2018). Frazão *et al.* (2023) observaram que a severidade da reabsorção óssea causada pela PA aos 28 dias é maior do que aos 14 dias, resultado similar ao obtido no presente estudo, o que demonstra que a severidade da destruição óssea está diretamente relacionada ao tempo de infecção.

Minhoto *et al.* (2021) analisaram o efeito do estresse crônico imprevisível na progressão da periodontite apical experimental em ratos aos 14, 21 e 28 dias. A severidade da extensão do infiltrado inflamatório progrediu dos 14 dias aos 21 dias, e dos 21 dias aos 28 dias, tanto no grupo estressado com PA quanto no grupo PA. Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo ao se analisar a perda óssea por Micro-CT. Confirmando a relação do tempo com a progressão e intensidade da PA, resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo.

Em que pese a importância dos resultados obtidos no presente estudo, estes devem ser interpretados com cautela, visto a limitação do modelo animal e a impossibilidade de extrapolação para seres humanos. Por esta razão, estudos futuros em humanos são necessários para avaliar a influência da progressão da PA nos parâmetros sanguíneos, histológicos e perda óssea periapical.

7 CONCLUSÕES

Baseado na metodologia descrita, pode-se concluir que:

1. No eritrograma, houve diminuição da concentração de hemácias e hemoglobina no período de 7 dias de indução de PA em relação aos períodos de 14, 28 e ao grupo controle. No leucograma houve um aumento dos leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos em todos os períodos experimentais, exceto no grupo controle, o que indica a progressão do processo infeccioso.
2. A periodontite apical causou um estado de estresse oxidativo significativo nos ratos Wistar, mantendo-se estável ao longo dos períodos de 7, 14 e 28 dias após a indução da doença.
3. A intensidade do infiltrado inflamatório foi aumentando com o passar do tempo, com estabilização a partir do período de 14 dias.
4. A reabsorção óssea periapical foi aumentando com o passar do tempo até o último período de análise. Este fato indica que a progressão da PA está diretamente relacionada ao aumento da resposta inflamatória e à subsequente destruição do tecido ósseo periapical.

Conclusão final

Conclui-se que o desenvolvimento e progressão da PA altera a morfologia e o padrão da expressão das células sanguíneas, assim como o estresse oxidativo sérico. Além disso, a severidade da inflamação e reabsorção óssea periapical se agravam com o tempo de desenvolvimento da PA.

REFERÊNCIAS

- Barbosa F, Costa B, Alfenas R, Paula S, Minim V, Bressan J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Rev Nutr.* 2010;23(4):629-43.
- Barcelos RCS, Rosa HZ, Roversi K, Tibúrcio-Machado CDS, Inchaki PT, Burger ME, Bier CAS. Apical periodontitis induces changes on oxidative stress parameters and increases Na⁺/K⁺-ATPase activity in adult rats. *Arch Oral Biol.* 2020;118:104849.
- Bian Z, Guo Y, Ha B, Zen K, Liu Y. Regulation of the inflammatory response: enhancing neutrophil infiltration under chronic inflammatory conditions. *J Immunol.* 2012;188(2):844-53.
- Brasilino MDS, Stringhetta-Garcia CT, Pereira CS, Pereira AAF, Stringhetta K, Leopoldino AM, Crivelini MM, Ervolino E, Dornelles RCM, Nakamune ACMS, Chaves-Neto AH. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves bone formation in the alveolar socket healing after tooth extraction in rats. *Clin Oral Investig.* 2018;22(3):1449-61.
- Cantiga-Silva C, Estrela C, Segura-Egea JJ, Azevedo JP, Oliveira PHC, Cardoso CBM, Pinheiro TN, Ervolino E, Sivieri-Araújo G, Cintra LTA. Inflammatory profile of apical periodontitis associated with liver fibrosis in rats: histological and immunohistochemical analysis. *Int Endod J.* 2021;54(8):1353-61.
- Chaparro CM, Suchdev PS. Anemia epidemiology, pathophysiology, and etiology in low- and middle-income countries. *Ann N Y Acad Sci.* 2019;1450(1):15-31.
- Chapple IL, Milward MR, Dietrich T. The prevalence of inflammatory periodontitis is negatively associated with serum antioxidant concentrations. *J Nutr.* 2007;137(3):657-64.
- Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Queiróz AO, Ervolino E, Sumida DH, Lima VM, Gomes-Filho JE. Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. *J Endod.* 2016;42(5):747-51.
- Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, Lima VM, Sumida DH, Coclete GA, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Apical periodontitis and periodontal disease increase serum IL-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. *Clin Oral Investig.* 2014a;18(9):2123-8.

Cintra LT, Silva Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Narciso LG, Bomfim SRM, Silva CO, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. *J Endod.* 2014b;40(8):1139-44.

Cintra LTA, Gomes MS, Silva CC, Faria FD, Benetti F, Cosme-Silva L, Samuel RO, Pinheiro TN, Estrela C, González AC, Segura-Egea JJ. Evolution of endodontic medicine: a critical narrative review of the interrelationship between endodontics and systemic pathological conditions. *Odontology.* 2021;109(4):741-69.

Colić M, Gazivoda D, Vučević D, Vasilijć S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol.* 2009;47(1):101-13.

Cosme-Silva L, Dal-Fabbro R, Cintra LTA, Ervolino E, Piazza F, Bomfim SM, Duarte PCT, Junior VEDS, Gomes-Filho JE. Reduced bone resorption and inflammation in apical periodontitis evoked by dietary supplementation with probiotics in rats. *Int Endod J.* 2020;53(8):1084-92.

Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37(4):277-85.

Failace R, Fernandes F. Hemograma: manual de interpretação. 6th ed. Porto Alegre: Artmed; 2015.

Fouad AF, Khan AA, Silva RM, Kang MK. Genetic and epigenetic characterization of pulpal and periapical inflammation. *Front Physiol.* 2020;11:21.

Frazão DR, Mendes PFS, Baia-da-Silva DC, Moura JDM, Santos VRN, Matos-Sousa JM, Balbinot GS, Guimarães DM, Collares FM, Lima RR. Modulation of blood redox status by the progression of induced apical periodontitis in rats. *Front Physiol.* 2023;14:1214990.

Frottier J, Modai J. Leucocytose et polynucléose en pathologie infectieuse. *Sem Hop.* 1975;51(10):659-6.

Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, Silva JS, Cunha FQ. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:25-31.

Gazivoda D, Dzopalic T, Bozic B, Tatomirovic Z, Brkic Z, Colic M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(7):605-11.

Georgiou AC, Cornejo Ulloa P, Van Kessel GMH, Crielaard W, Van der Waal SV. Reactive oxygen species can be traced locally and systemically in apical periodontitis: a systematic review. *Arch Oral Biol.* 2021;129:105167.

Gkrania-Klotsas E, Ye Z, Cooper AJ, Sharp SJ, Luben R, Biggs ML, Chen LK, Gokulakrishnan K, Hanefeld M, Ingelsson E, Lai WA, Lin SY, Lind L, Lohsoonthorn V, Mohan V, Muscari A, Nilsson G, Ohrvik J, Chao Qiang J, Jenny NS, Tamakoshi K, Temelkova-Kurktschiev T, Wang YY, Yajnik CS, Zoli M, Khaw KT, Forouhi NG, Wareham NJ, Langenberg C. Differential white blood cell count and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of cross-sectional and prospective studies. *PLoS One.* 2010;5(10):e13405.

Greer JP, Arbe DA, Glader BE, List AF, Means RM, Rodgers GM. *Wintrobe's clinical hematology.* 14th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019.

Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine.* 4th ed. Oxford: Clarendon; 2007.

Hernández-Ríos P, Pussinen PJ, Vernal R, Hernández M. Oxidative stress in the local and systemic events of apical periodontitis. *Front Physiol.* 2017;8:869.

Inchingolo F, Marrelli M, Annibali S, Cristalli MP, Dipalma G, Inchingolo AD, Palladino A, Inchingolo AM, Gargari M, Tatullo M. Influence of endodontic treatment on systemic oxidative stress. *Int J Med Sci.* 2013;11(1):1-6.

Jakovljevic A, Knezevic A, Karalic D, Soldatovic I, Popovic B, Milasin J, Andric M. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. *Aust Endod J.* 2015;41(2):72-7.

Jakovljevic A, Nikolic N, Jacimovic J, Pavlovic O, Milicic B, Beljic-Ivanovic K, Miletic M, Andric M, Milasin J. 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. *J Endod.* 2020;46(10):1371-86.e8.

Justo MP, Cardoso CBM, Cantiga-Silva C, Oliveira PHC, Sivieri-Araújo G, Azuma MM, Ervolino E, Cintra LTA. Curcumin reduces inflammation in rat apical periodontitis. *Int Endod J*. 2022;55(11):1241-51.

Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol*. 1999;44(1):55-66.

Klinken SP. Red blood cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002;34(12):1513-8.

Knoll JS, Rowell SL. Clinical hematology. In-clinic analysis, quality control, reference values, and system selection. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1996;26(5):981-1002.

Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J*. 2003;36(7):464-71.

Maciejczyk M, Mikoluc B, Pietrucha B, Heropolitanska-Pliszka E, Pac M, Motkowski R, Car H. Oxidative stress, mitochondrial abnormalities and antioxidant defense in Ataxia-telangiectasia, Bloom syndrome and Nijmegen breakage syndrome. *Redox Biol*. 2017;11:375-83.

Malandrino N, Wu WC, Taveira TH, Whitlatch HB, Smith RJ. Association between red blood cell distribution width and macrovascular and microvascular complications in diabetes. *Diabetologia*. 2012;55(1):226-35.

Marotta PS, Fontes TV, Armada L, Lima KC, Roças IN, Siqueira JF. Type 2 diabetes mellitus and the prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment in an adult Brazilian population. *J Endod*. 2012;38(3):297-300.

Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *J Endod*. 2012;38(6):740-5.

Márton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2000;15(3):139-50.

Minhoto GB, Khoury RD, Orozco EIF, Prado RF, Valera MC. Effect of chronic unpredictable stress on the progression of experimental apical periodontitis in rats. *Int Endod J*. 2021;54(8):1342-52.

Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(6):348-81.

Nairz M, Theurl I, Wolf D, Weiss G. Iron deficiency or anemia of inflammation?: differential diagnosis and mechanisms of anemia of inflammation. *Wien Med Wochenschr*. 2016;166(13-14):411-23.

Odagiri K, Uehara A, Mizuta I, Yamamoto M, Kurata C. Longitudinal study on white blood cell count and the incidence of metabolic syndrome. *Intern Med*. 2011;50(21):2491-8.

Prieto AKC, Gomes-Filho JE, Azuma MM, Sivieri-Araújo G, Narciso LG, Souza JC, Ciarlini PC, Cintra LTA. Influence of apical periodontitis on stress oxidative parameters in diabetic rats. *J Endod*. 2017;43(10):1651-6.

Samuel RO, Ervolino E, Queiroz ÍOA, Azuma MM, Ferreira GT, Cintra LTA. Th1/Th2/Th17/Treg balance in apical periodontitis of normoglycemic and diabetic rats. *J Endod*. 2019;45(8):1009-15.

Samuel RO, Gomes-Filho JE, Azuma MM, Sumida DH, Oliveira SHP, Chiba FY, Bomfim SRM, Ciarlini PC, Narciso LG, Cintra LTA. Endodontic infections increase leukocyte and lymphocyte levels in the blood. *Clin Oral Investig*. 2018;22(3):1395-401.

Sathyanarayanan K, Ranjana NI, Bhavana M, R M, Sankar A, Mirnalini S. Asymptomatic apical periodontitis lesions and their association with systemic inflammatory burden: a preliminary prospective clinical study. *Cureus*. 2023;15(10):e46357.

Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*. 2007;86(4):306-19.

Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:498-21.

Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen: ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endod Topics*. 2003;6:3-28.

Tibúrcio-Machado CS, Michelon C, Zanatta FB, Gomes MS, Marin JA, Bier CA. The

global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2021;54(5):712-35.

Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med.* 2005;352(10):1011-23.

Wik JA, Skålhegg BS. T Cell Metabolism in Infection. *Front Immunol.* 2022;13:840610.

Xiao S, Lei H, Li P, Ma D, Chen S, Huang X. Is oxidative stress involved in the hepatic inflammatory response to apical periodontitis? A comparative study in normal and hyperlipidaemic rat. *Int Endod J.* 2023;56(6):722-33.

ANEXOS

ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa Animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Análise do Desenvolvimento e Progressão da PA: Parâmetros sanguíneos, histológicos e análise por Micro-CT", Processo FOA nº 265-2024, sob responsabilidade de Luciano Tavares Angelo Cintra apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 22 de Maio de 2024.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 30 de Junho de 2025.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Julho de 2025.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Analysis on the Development and Progression of AP: Blood, histological parameters and Micro-CT analysis", Protocol FOA nº 265-2024, under the supervision of Luciano Tavares Angelo Cintra presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 22, 2024.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: June 30, 2025.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: July 30, 2025.

Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

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