

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Área de concentração em Endodontia

Flávio Duarte Faria

**Influência da antibioticoterapia sistêmica no perfil
inflamatório da periodontite apical induzida em Ratos
Wistar. Estudo histológico, microbiológico e
imunoistoquímica para CD4, CD8, CD20, CD45 e CD57.**

Araçatuba – SP
2025

Flávio Duarte Faria

**Influência da antibioticoterapia sistêmica no perfil
inflamatório da periodontite apical induzida em Ratos
Wistar. Estudo histológico, microbiológico e
imunoistoquímica para CD4, CD8, CD20, CD45 e CD57.**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Endodontia

Orientador(a): Prof. Dr. Luciano Tavares
Angelo Cintra

Araçatuba - SP
2025

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F224i Faria, Flávio Duarte.
Influência da antibioticoterapia sistêmica no perfil inflamatório da periodontite apical induzida em ratos wistar : estudo histológico, microbiológico e imunoistoquímica para CD4, CD8, CD20, CD45 e CD57 / Flávio Duarte Faria. - Araçatuba, 2025
53 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientador: Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra

1. Antibacterianos 2. Mediadores da inflamação
3. Periodontite periapical I. T.

Black D24
CDD 617.67

Dedico este trabalho à minha Filha Clara, que transformou profundamente o meu mundo. O seu nascimento trouxe luz, equilíbrio e um novo significado a cada passo da minha jornada. Em cada página deste trabalho, há um pouco da força e da inspiração que encontrei ao olhar para você. Que esta conquista seja também um reflexo do amor imenso que me move desde o instante em que você chegou.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa, Raíssa Schwam, pelo amor, paciência, apoio e companheirismo. Sua presença foi essencial para que eu mantivesse o equilíbrio e a motivação diante das dificuldades desta trajetória.

Aos meus pais, Max e Márcia, por todo amor, exemplo, apoio incondicional e pelos valores que me guiaram ao longo de toda a vida. Nada disso seria possível sem o esforço, a dedicação e a confiança de vocês, que sempre acreditaram em mim e me incentivaram a seguir em frente, mesmo diante dos maiores desafios.

Ao meu irmão Victor Duarte Faria e à minha cunhada Mariana Kateivas, pelo carinho, apoio e amizade ao longo dessa caminhada, principalmente durante nosso período em Sevilha. A presença e o incentivo de vocês sempre trouxeram leveza e alegria aos momentos mais desafiadores.

À minha família de Jaboticabal, Tia Mônica, Tio Ivo, Tia Daniela, e meus primos Guilherme, Bruno, Rafael e Laís, por todo apoio, incentivo e pelos bons momentos compartilhados ao longo dessa jornada.

À minha família de Araras, Tio Sérgio, Tio Maurício, Tia Rita, Tia Ana e todos os primos de lá, e em especial à minha avó Sônia, pelo carinho constante e pela ajuda inestimável durante toda a pós-graduação. Mesmo à distância, nunca deixaram faltar afeto, presença e incentivo.

Ao meu tio e professor, Marco Hungaro, pela inspiração, pelos conselhos e pelo exemplo de dedicação à docência e à pesquisa. Sua trajetória sempre foi uma grande referência para mim, tanto no campo profissional quanto pessoal.

Aos meus avós Max e Henrique e Sheyla e à minha Madrinha Vera, por todos os ensinamentos de vida, que permanecem comigo e continuam a me inspirar diariamente, mesmo não estando mais aqui para compartilhar deste momento.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra, pela confiança ao me aceitar como orientado, pela orientação segura, pelos ensinamentos científicos e pela liderança inspiradora. Sua dedicação e capacidade de manter o grupo unido e motivado servem como exemplo de ética e profissionalismo.

Aos meus amigos e parceiros de pesquisa, Pedro Chaves, Cristiane Cantiga, Carol Barros, e Mariana Justo, Juliana Goto, Marcos Berti, Carol Wajima, Nathália Machado, Gabriella Gallo, Gladiston Lobo, Yuri Chamorro, Laura Cesário, Romulo Sales, pela amizade, colaboração e apoio mútuo nas diversas etapas desta jornada. Sem vocês, este percurso não teria sido o mesmo.

Aos demais amigos da pós-graduação, pela convivência, pelas conversas e pela ajuda, direta ou indireta, em diferentes momentos do doutorado.

Aos professores da disciplina de Endodontia, Prof. João Eduardo Gomes, Prof. Elói Dezan, Prof. Rogério de Castilho, Prof. Gustavo Sivieri e Prof. Carlos Emerenciano Bueno pela convivência agradável e pela constante disposição em colaborar e orientar sempre que necessário.

Aos professores da disciplina de Clínica Integrada, Daniela Brandini, Celso, Douglas, Aline e Leonardo Raniel, pelo período de estágio docência, o qual tive a oportunidade de aprender e evoluir profissionalmente com cada um de vocês. A convivência, o apoio e os ensinamentos foram fundamentais para meu crescimento como futuro docente.

Aos meus professores do curso de especialização, Murilo Alcalde, Guilherme Ferreira, Renan Furlan e Paulo Jara, pelos ensinamentos, incentivo e pela base sólida de conhecimento que contribuíram de forma significativa para minha formação profissional e prática clínica.

Aos funcionários do Departamento de Endodontia, Carlos, Jorge e Autran, pela atenção, disponibilidade e apoio constantes. A dedicação de vocês foi essencial para o bom andamento das atividades laboratoriais e do dia a dia acadêmico, contribuindo de forma significativa para a realização deste trabalho.

Aos meus orientadores durante o período de doutorado sanduíche na Universidad de Sevilla, Profa. Dra. Aurea Simón-Soro e Prof. Dr. Juan Segura-Egea, pela valiosa orientação, receptividade e oportunidade de aprendizado em um ambiente científico tão enriquecedor. Aos colegas de laboratório, Maria Jiménez, Débora, Arya, Carlos Saúco e Alexey, pela convivência agradável, colaboração e apoio durante todo o período na Espanha. A troca de experiências e o acolhimento de cada um de vocês tornaram essa etapa acadêmica ainda mais significativa.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, representada pelo Diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem, e pelo Vice-Diretor, Prof. Assoc. Luciano Tavares Angelo Cintra, pela estrutura e apoio institucional indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos de graduação, Arthur Lacerda, Bianca Bernardes, Guilherme Pimenta, Lucas Marcondes, Tiago Esgalha, Vinícius Orasmo e Ana Beatriz Laguna, por todas as experiências, risadas e aprendizados compartilhados ao longo desses anos.

aos amigos de infância, Guilherme Lopes, Geraldo Papa Junior e Leonardo Mascoli, pela amizade sincera e duradoura, que mesmo à distância, permanece presente e significativa.

Aos meus amigos de clínica, Lucas Piacenza e João Paulo do Vale, pela amizade, companheirismo e pela constante troca de conhecimentos durante os atendimentos. A convivência e o aprendizado compartilhado com vocês tornaram essa jornada mais leve e enriquecedora.

Aos meus colegas de trabalho na FAI, Prof. Fábio Perassi e Profa. Livia Maluf, pela parceria, apoio e convivência na disciplina de Endodontia. A colaboração e o diálogo constante com vocês contribuíram significativamente para meu crescimento profissional e docente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de pesquisa, indispensável para realização deste trabalho e para me manter durante a pós-graduação.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”

Cora Coralina

RESUMO

FARIA, F.D. **Influência da antibioticoterapia sistêmica no perfil inflamatório da periodontite apical induzida em ratos Wistar. Estudo histológico, microbiológico e imunoistoquímica para CD4, CD8, CD20, CD45 e CD57. 2025.** Tese de Doutorado – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

Este estudo investigou a influência da antibioticoterapia sistêmica sobre a PA instalada. Para isso, 56 ratos foram divididos em 7 grupos (n=8): PA21 – PA de 21 dias ; PA36 (PA de 36 dias); AMO (PA tratado com Amoxicilina); MET (PA tratada com Metronidazol); AMP (PA tratada com Ampicilina); AM+C (PA tratada com Amoxicilina + Clavulanato de Potássio) e CLI (PA tratada com Clindamicina). A PA foi induzida pela exposição pulpar do 1º molar inferior do lado direito. Após 21 dias, os tratamentos foram iniciados e mantidos por 15 dias, até o sacrifício. No 21º e 36º dias foi realizada coleta microbiológica do canal distal e da saliva. Após a morte, as mandíbulas foram removidas e processadas para as análises: histológica e histométrica em coloração de H&E maturação colágena em picrosirius red; microbiológica em Brown e Brenn; e imunohistoquímica para CD4, CD8, CD20, CD45 e CD57. Testes estatísticos foram aplicados ($p<0,05$). O grupo PA36 apresentou inflamação mais intensa, maior perda óssea e menor maturação colágena comparado a PA21 ($p<0,05$). Os grupos tratados não foram diferentes de PA21 e PA36 quanto à inflamação e maturação colágena ($p>0,05$). Os grupos AMO, MET, AMP e AM+C apresentaram menor perda óssea em relação à PA36 ($p<0,05$), enquanto os grupos AMO e AM+C foram semelhantes a PA21 ($p>0,05$). Para CD4, o grupo PA36 apresentou maior imunomarcagem em relação à PA21, AMO, MET, AMP e AM+C ($p<0,05$). Para CD45, o grupo PA36 apresentou maior imunomarcagem em relação à PA21, AMO e AM+C ($p<0,05$). Não houve diferença para os outros imunomarcadores ($p>0,05$). Todos os grupos apresentaram bactérias no terço apical da raiz, incluindo o forame ($p>0,05$). O grupo AMO e AM+C apresentaram menor carga microbiana salivar em relação aos demais grupos ($p<0,05$). Não houve diferença para carga microbiana do canal radicular, assim como para *Streptococcus* spp. e fungos na saliva e no canal radicular ($p>0,05$). A antibioticoterapia não impediu a progressão dos microrganismos, não alterou a carga microbiana do canal radicular; alterou a microbiota salivar, no entanto, reduziu a perda

óssea periapical, modulou a resposta inflamatória, evidenciada pela diminuição das células CD4⁺ e CD45⁺, e favoreceu a maturação das fibras colágenas.

Palavras-chave: Antibacterianos, Mediadores da inflamação. periodontite periapical

ABSTRACT

FARIA, F. D. "Influence of Systemic Antibiotic Therapy on the Inflammatory Profile of Induced Apical Periodontitis in Wistar Rats: Histological, Microbiological, and Immunohistochemical Study for CD4, CD8, CD20, CD45, and CD57. 2025. Tese de Doutorado – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

This study investigated the influence of systemic antibiotic therapy on established AP. Fifty-six rats were divided into seven groups (n=8): AP21 (21-day AP); AP36 (36-day AP); AMO (AP treated with amoxicillin); MET (AP treated with metronidazole); AMP (AP treated with ampicillin); AM+C (AP treated with amoxicillin + potassium clavulanate); and CLI (AP treated with clindamycin). AP was induced by pulp exposure of the mandibular first molar on the right side. After 21 days, treatments were initiated and maintained for 15 days until sacrifice. On days 21 and 36, microbiological collection of the distal root canal and saliva was performed. After death, the mandibles were removed and processed for the following analyses: histological and histometric analysis in H&E staining; collagen maturation in picrosirius red; Microbiological analysis was performed using Brown and Brenn; and immunohistochemistry for CD4, CD8, CD20, CD45, and CD57. Statistical tests were applied ($p<0.05$). The PA36 group showed more intense inflammation, greater bone loss, and lower collagen maturation compared to PA21 ($p<0.05$). The treated groups were not different from PA21 and PA36 regarding inflammation and collagen maturation ($p>0.05$). The AMO, MET, AMP, and AM+C groups showed less bone loss compared to PA36 ($p<0.05$), while the AMO and AM+C groups were similar to PA21 ($p>0.05$). For CD4, the PA36 group showed greater immunostaining compared to PA21, AMO, MET, AMP, and AM+C ($p<0.05$). For CD45, the PA36 group showed greater immunostaining compared to PA21, AMO, and AM+C ($p<0.05$). There was no difference for the other immunomarkers ($p>0.05$). All groups presented bacteria in the apical third of the root, including the foramen ($p<0.05$). The AMO and AM+C groups presented a lower salivary microbial load compared to the other groups ($p<0.05$). There was no difference for the microbial load of the root canal, as well as for *Streptococcus* spp. and fungi in saliva and in the root canal ($p>0.05$). Antibiotic therapy did not prevent the progression of microorganisms, nor did it alter the microbial load of the root canal; however, it altered the salivary microbiota, reduced periapical bone loss, modulated the inflammatory response,

evidenced by a decrease in CD4⁺ and CD45⁺ cells, and favored the maturation of collagen fibers.

Keywords: Anti-Bacterial Agents, Inflammation Mediators, Periapical Periodontitis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Linha do tempo para os períodos de indução, antibioticoterapia sistêmica e eutanásia. 22

Figura 2 – Cortes histológicos representativos corados em H&E em aumentos originais de 50x (A-G), 100x (a1-g1) e 400x (a2-g2) e corados em Picrosirius Red em aumentos originais de 400x (a3-g3). Os grupos PA21, PA36, AMO, MET, AMP, AM+C e CLI estão representados pelas letras A, B, C, D, E, F, G, respectivamente. Gráfico de caixa comparando a mediana da inflamação dos grupos e gráfico de barras comparando a média de fibras maduras e imaturas de cada grupo. 29

Figura 3 – Cortes histológicos representativos da imunoistoquímica em aumento de 400x para CD4 (A1-G1), CD8 (A2-G2), CD20 (A3-G3), CD45 (A4-G4) e CD57 (A5-G5). Os grupos PA21, PA36, AMO, MET, AMP, AM+C e CLI estão representados pelas letras A, B, C, D, E, F, G, respectivamente. Gráfico de caixa comparando a média da imunomarcação de CD4, CD8, CD20, CD45 e CD57 (H1-H5) de todos os grupos. 31

Figura 4 – Cortes histológicos representativos corados em Brown e Brenn em aumentos originais de 200x (A1-G1), 400x (A2-G2). Os grupos PA21, PA36, AMO, MET, AMP, AM+C e CLI estão representados pelas letras A, B, C, D, E, F, G, respectivamente. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escores e mediana da intensidade do infiltrado inflamatório e média e desvio padrão do tamanho das lesões periapicais de cada grupo.	30
Tabela 2 – Média e desvio padrão do número d células imunomarcadas para cada marcador nos diferentes grupos.	32
Tabela 3 – Porcentagens de fibras colágenas e desvio padrão de acordo com o grupo.	33
Tabela 4 – Escores e mediana da presença de bactérias por terços do canal radicular.	33
Tabela 5 - Média e desvio-padrão da contagem de UFCs na saliva aos 21 e 36 dias.	35
Tabela 6 - Média e desvio padrão da contagem de UFCs nos canais radiculares nos diferentes grupos	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Animais	20
3.2 Drogas	21
3.3 Indução da periodontite apical	22
3.4 Grupos Experimentais	23
3.5 Sacrifício e Processamento laboratorial	23
3.6 Forma de Análise de Resultados	24
4 RESULTADOS	28
5 DISCUSSÃO	36
6 CONCLUSÃO	44
7 REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A Periodontite Apical (PA) é formada em decorrência da necrose e infecção pulpar. Histologicamente é caracterizada por tecido de granulação, infiltrado por diferentes tipos de células inflamatórias (Colic et al., 2010). Neste processo, o hospedeiro possui resposta que envolve, tanto o recrutamento das células inflamatórias, quanto uma extensa rede de mecanismos imunológicos, incluindo a produção de citocinas, que estão associadas com o desenvolvimento da PA (Xiong et al., 2009). Parte dessas citocinas é sintetizada em resposta às bactérias e seus produtos, induzindo e mantendo a resposta inflamatória (Xiong et al., 2009, Colic et al., 2010), e levando à destruição da matriz extracelular e reabsorção óssea (Nair, 2004; Graves et al., 2011).

O sistema de canais radiculares é tratado por meio da desinfecção químico-mecânica, para remoção do tecido pulpar, remanescentes de dentina e dos microrganismos presentes (Prada et al., 2019). Em canais contaminados é indicado a medicação intracanal entre as sessões do tratamento (Zancan et al., 2016). Ocasionalmente, pacientes podem apresentar sinais sistêmicos como febre, mal-estar e linfadenopatias, sendo que nessas situações é recomendado o uso da antibioticoterapia sistêmica, acompanhado do tratamento do canal e drenagem do abscesso, caso esteja presente (American Association of Endodontists, 2017). O antibiótico também pode ser utilizado de maneira profilática quando o paciente for imunocomprometido ou tiver predisposição a endocardite bacteriana, dentre outras alterações sistêmicas (American Association of Endodontists, 2017).

Por muito tempo, as infecções foram a causa de muitas mortes e o surgimento dos antimicrobianos teve um impacto muito positivo para a sociedade, diminuindo a morbidade e a mortalidade, proporcionando aos profissionais de saúde opções terapêuticas para doenças severas (Zaffiri et al., 2012). Existem várias classes de antibióticos, com diferentes mecanismos de ação, dentre os quais se destacam os β -lactâmicos, representados pela Penicilina (Amoxicilina e Ampicilina), que atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana (Lang et al., 2016); os Nitroimidazólicos (Metronidazol) que interferem na síntese de ácidos nucleicos (Soares et al., 2012); e as lincosamidas (clindamicina), que têm propriedades antibacterianas similares aos

macrolídeos e agem penetrando no meio intracelular bacteriano e inibindo a síntese de proteínas (Li et al., 2016).

A amoxicilina possui amplo espectro e é o antibiótico de primeira escolha por grande parte dos endodontistas do Brasil (Bolfoni et al., 2018), podendo ser utilizada no tratamento de várias infecções bacterianas (Cheng et al., 2018). Este medicamento age se ligando e inibindo várias proteínas bacterianas que estão envolvidas na síntese de parede celular, tanto em gram-positivas, quanto em gram-negativas (American Association of Endodontists, 2017). Muitos microrganismos presentes nas infecções endodônticas são suscetíveis à amoxicilina como o *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Actinomyces viscosus* e *Staphylococcus aureus* (Di Santi et al., 2015). Acrescenta-se que a amoxicilina já se mostrou com menor taxa de resistência bacteriana *in vitro* em relação a outros antibióticos (Lang et al., 2016).

As penicilinas têm sido muito indicadas como antibióticos de primeira escolha, pois funcionam muito bem contra a maior parte das bactérias envolvidas na infecção endodôntica e, também, por possuírem poucos efeitos colaterais (Oberoi et al., 2015). Por outro lado, existem momentos em que a penicilina por si só não é eficaz e, nesses casos, pode ser recomendada a associação da penicilina com inibidores da beta-lactamases, como por exemplo a amoxicilina associada ao ácido clavulânico, aumentando o espectro de ação (Lang et al., 2016). Essa associação tem sido a segunda escolha pela maior parte dos endodontistas, segundo um levantamento feito em 2018 (Bolfoni et al., 2018). A associação da amoxicilina com o ácido clavulânico possui baixa taxa de resistência das bactérias (*in vitro*) presentes nas infecções endodônticas (Lang et al., 2016).

Outro antibiótico frequentemente utilizado é a Ampicilina. Esta foi a primeira penicilina semissintética desenvolvida que se mostrou útil no tratamento de infecções mediadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas, abrindo o campo de penicilinas de amplo espectro. É comercializada na forma anidra, tri-hidratada e sódica, bem como nas formas de depósito, isto é, ligada à benzatina (Cione et al., 2010, Nairi et al., 2017). Em um estudo feito para analisar a susceptibilidade deste antibiótico frente aos patógenos presentes na infecção endodôntica sintomática foi demonstrado que todos os microrganismos testados foram muito sensíveis à

ampicilina (Skukaite et al., 2010). Adicionalmente, tem sido relatado que a resistência à ampicilina não é usual em cepas de *E. faecalis* isolada de pacientes com PA, mostrando ainda uma taxa de suscetibilidade de 91% (Saffari et al., 2018). Por isso, a ampicilina pode ser muito eficaz no auxílio ao tratamento de infecções endodônticas e é o antibiótico de primeira escolha pelos endodontistas de outros países, segundo uma revisão de literatura feita em 2017 (Segura-Egea et al. 2017).

O metronidazol é um antibiótico que atua contra bactérias anaeróbias (Silva e Anjos Neto, 2014), sendo recomendado para uso em associação com a penicilina, com a finalidade de aumentar seu espectro de ação (Alfenas et al., 2014). Este antibiótico possui atividade antiprotozoária, mas também atividade antibacteriana contra bacilos gram-negativos anaeróbios, contra bacilos gram-positivos esporulados e contra todos os cocos anaeróbios (Silva e Anjos Neto, 2014). Por ser um antibiótico importante no tratamento contra anaeróbios, é muito indicado nas infecções relacionadas à cavidade oral (Soares et al., 2012). Acredita-se que seu mecanismo de ação envolva quatro fases: entrada na célula bacteriana; redução do grupo nitro; efeito citotóxico do produto reduzido; e lançamento de produtos finais que estão inativos. Portanto, esses metabólitos seriam o componente-chave para o efeito bactericida do metronidazol (Soares et al., 2012). Por outro lado, microrganismos anaeróbios presentes nas infecções endodônticas já apresentaram resistência a esse medicamento (Skukaite et al., 2010).

A clindamicina é um antibiótico semissintético derivado da lincomicina e ativo contra bactérias gram-positivas aeróbias, gram-positivas anaeróbias e gram-negativas (Lammintausta et al., 2002). Tem sido amplamente utilizado em pacientes com histórico alérgico a outros antibióticos (Skukaite et al., 2010) e tem substituído a lincomicina devido ao seu perfil de segurança melhorado (Li et al., 2016). A clindamicina inibe a síntese proteica bacteriana através da ligação às subunidades ribossômicas 50S bacterianas. Pode ser bacteriostático ou bactericida dependendo do organismo e da concentração da droga (Rosenberg, 1996). No Brasil, a maior parte dos endodontistas utiliza a clindamicina em pacientes alérgicos às penicilinas (Bolfoni et al., 2018).

Quando a polpa dentária é exposta a microrganismos, pode ocorrer tanto uma resposta imunológica específica, quanto não específica na região periapical (Stashenko et al., 1998). Assim as células imunoativas produzem mediadores para resposta inflamatória, incluindo anticorpos e citocinas (Stern et al., 1981). A resposta imunológica inata não específica é uma resposta rápida a um grande número de estímulos. É representada por barreiras físicas, químicas, biológicas, células especializadas e está presente em todos indivíduos, tendo contato ou não com agentes agressores. Suas principais células são os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células Natural Killers (NK). Já a resposta imune adquirida, necessita da ativação de células especializadas (linfócitos) e de suas moléculas solúveis. Suas principais características são a especificidade de reconhecimento, diversidade de reconhecimento, memória, resposta especializada e tolerância a componentes do próprio organismo (Cruvinel et al., 2010).

Os linfócitos são divididos em dois subtipos, Linfócitos B e Linfócitos T. Os Linfócitos B são precursores das células formadoras de anticorpos, já os linfócitos T, participam das reações de hipersensibilidade tardia, e ambas estão presentes nas lesões periapicais (Torabinejad et al., 1985). Utilizando o marcador CD8 é possível identificar os Linfócitos T citotóxicos e supressores, e o marcador CD20, para a identificação de Linfócitos B, determinando assim, parte da resposta inflamatória e seus mecanismos.

O desenvolvimento da resposta imunológica por células T, depende da resposta imune inata, associada às células apresentadora de antígenos, que após a captura do antígeno, sofre maturação e migra para os gânglios linfáticos, onde produz diferentes padrões de citocinas, que contribuirá para a ativação dos Linfócitos T CD4+ (Cutler et al., 2000). As células T CD4+ eram subdivididas em T-helper 1 (Th1) e T-helper 2 (Th2) (Murphy et al., 2002), sendo que a Th1 está associada a resposta inflamatória infecciosa e destruição óssea e Th2 destinado a minimizar as perdas ósseas (Cólic et al., 2009, Graves et al., 2011). Porém houve a descoberta de novas subdivisões das células T-helper, com um importante papel da resposta do hospedeiro em doenças inflamatórias crônicas, incluindo a doença periodontal (Graves et al., 2011, Silva et al., 2007). As células Th17 apareceram como um importante subconjunto, responsáveis pela resposta inflamatória a doenças infecciosas,

autoimunes e processos osteolíticos (Jeffcoat et al.,1991, Dong et al., 2008). As células Th9 e Th22 possuem um papel importante na modulação da resposta imunológica (Mucida et al., 2010, Jager et al., 2010) e as células Th1, Th2, Th17 e T-regulador, apresentam um importante papel na condução das respostas imunes adaptativas e inflamatórias a diversos agentes infecciosos (Silva et al.,2015).

O CD45 é uma proteína tirosina fosfatase (PTP), que é expressa por células hematopoiéticas, com exceção de plaquetas e eritrócitos maduros, e desempenha papéis importantes na transdução de sinal do receptor de células T e do receptor de células B (Rheinländer et al., 2018). Assim, o marcador CD45 possibilita observar a presença de todas as células leucocitárias (neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos).

O marcador CD57, identifica as célula NK, que são uma linhagem diferente dos linfócitos citotóxicos, sendo o componente mais importante da resposta imune inata e mediada por células (Stelin et al., 2009). Essas células se desenvolvem na medula óssea, não possuem receptores de células, e têm a capacidade de matar células-alvo sem sensibilização prévia por contato direto com a mesma, além de produzir citocinas pró-inflamatórias, especialmente interferon gama. Essas células são essenciais não apenas para a defesa contra patógenos, mas também para o início da resposta imune adaptativa e para a regulação de mecanismos autoimunes (Yokoyama et al.,2004, Mitroi et al.,2019). O papel das células NK nas doenças orais ainda não foi totalmente estabelecido, apesar de já ter sido demonstrado uma correlação positiva entre a citotoxicidade das células NK no sangue periférico e o grau da doença periodontal (Tsoumis et al.,1985). Também já foi verificado aumento na infiltração do tecido conjuntivo gengival por células NK na doença periodontal em estágio avançado sugerindo que essas células possam desempenhar um papel na destruição dos tecidos de suporte (Fugita et al. 1992).

Um estudo anterior, realizado em modelo animal, demonstrou que a administração sistêmica de antibióticos durante o desenvolvimento da periodontite apical resultou em menor resposta inflamatória e redução da perda óssea periapical, além de diminuir a velocidade de progressão de microrganismos no interior do canal radicular, em sentido apical (Faria et al., 2024). Uma possível explicação para estes

achados está na presença da vascularização remanescente no tecido pulpar durante as fases iniciais da doença, a qual permitiria a difusão do antibiótico até o interior do canal. No entanto, permanece incerta a eficácia da antibioticoterapia sistêmica em lesões periapicais já estabelecidas, especialmente em relação à modulação do perfil inflamatório e à alteração da composição microbiológica do canal radicular nessas condições avançadas. Assim, torna-se necessário observar, não só a presença de microrganismos nos diferentes terços do canal, mas também conhecer o conteúdo microbiológico do canal radicular e da saliva.

A cavidade oral é um ecossistema dinâmico, e a saliva, em particular, serve como reservatório para troca microbiana entre vários nichos, incluindo os canais radiculares. A saliva contém microrganismos excretados de diversas superfícies orais, como língua, mucosa, biofilme dentário e sulcos gengivais, refletindo a composição microbiana oral geral (Aas et al., 2005; Dewhirst et al., 2010). Ela também facilita a transmissão e a recolonização de micróbios, influenciando potencialmente a ecologia microbiana de infecções periodontais e endodônticas (Simon-Soro & Mira, 2015). No entanto, poucos estudos avaliaram simultaneamente o impacto de antibióticos sistêmicos na microbiota salivar e endodôntica in vivo. Moraes et al. (2020) demonstraram que o nicho ecológico tem uma forte influência no conteúdo bacteriano de amostras de diversos sítios orais e que a exposição prévia a antibióticos pode afetar a composição filogenética da saliva. A maioria das investigações existentes concentra-se nos resultados clínicos ou nos efeitos dos antibióticos no microbioma sistêmico ou na saliva, de forma independente (Zaura et al., 2015; Cheng et al., 2022). Avaliações integradas da influência dos antibióticos na microbiota salivar e do canal radicular em modelos experimentais controlados permanecem limitadas, ressaltando a relevância do estudo atual.

Diante do exposto, propomos verificar a influência da administração de antibióticos por via sistêmica sobre o perfil inflamatório e reabsortivo da PA, sobre a maturação colágena da PA, sobre a contaminação do canal radicular, assim como sua influência sobre a microbiota salivar e do canal radicular, utilizando o modelo animal em Ratos Wistar. De forma indireta, o estudo também permitiu identificar o potencial de cada um dos antibióticos em inibir o desenvolvimento da infecção endodôntica.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi verificar a influência da antibioticoterapia sistêmica dos antibióticos Amoxicilina, Metrodnidazol, Ampicilina, Amoxicilina associada ao Clavulanato de Potássio e Clindamicina no perfil inflamatório e reabsortivo da PA, na maturação colágena da PA, na contaminação do canal radicular, assim como sua influência sobre a microbiota salivar e do canal radicular em Ratos Wistar.

Os objetivos específicos são:

- Analisar o perfil inflamatório da PA por meio da análise histológica em coloração de H&E e por imunoistoquímica para células inflamatórias específicas por meio dos imunomarcadores CD4, CD8, CD20, CD45 e CD57;
- Analisar o perfil reabsortivo da PA por meio da análise histométrica em coloração de H&E;
- Analisar a maturação de fibras colágenas através da coloração de picrosirius red;
- Analisar a extensão da contaminação do canal radicular pela coloração de Brown e Brenn;
- Analisar amostras microbiológicas do canal radicular e da saliva, quanto à carga microbiana, *Streptococcus* spp. e fungos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 56 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 250 gramas, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Os animais foram mantidos em mini-isoladores (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), quatro ratos por isolador, alimentados durante todo período experimental com dieta sólida e água “*ad libitum*”, com exceção nas 12 horas que antecederam o procedimento cirúrgico e 6 horas após o procedimento. Antes de iniciar os experimentos, os animais ficaram em quarentena para adaptação ao novo habitat e para contenção de alguma possível doença de fácil propagação. Os procedimentos experimentais propostos neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 2019-0389).

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 a base de Xilazina 2% (Xilazin, Syntec do Brasil Ltda., Cotia, SP, Brasil) na dosagem de 10 mg/Kg, associado ao Cloridrato de Cetamina 10% (Ketamina, Agener - União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil) na dosagem de 80 mg/Kg, via intramuscular.

Para eutanásia, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Lidocaína 1% (Xylestesin, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil) na dosagem de 10 mg/Kg via intraperitoneal, seguido do Tiopental Sódico (Thiopentax, Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil) na dosagem de 150 mg/Kg via intraperitoneal.

Os grupos de tratamento foram compostos por 5 antibióticos:

- Amoxicilina (Agemoxi, Agener - União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, SP, Brasil), via intraperitoneal, na dose de 100mg/kg, uma vez ao dia;
- Metronidazol (Flagyl, Sanofi - Aventis Farmacêutica Ltda., São Paulo, SP, Brasil), via intraperitoneal, na dose 40mg/kg, uma vez ao dia;
- Ampicilina (Ampicilina, Vetnil - Industria e Comercio de Produtos Veterin Ltda., Louveira, SP, Brasil) via intraperitoneal, na dose de 100mg/kg, uma vez ao dia;

- Amoxicilina + clavulanato de potássio (Clavacillin, Norbrook - Laboratories Inc., Newry, Ulster, Irlanda do Norte) via intraperitoneal, na dose de 100mg/kg, uma vez ao dia;

- Clindamicina (Hyclin, Hypofarma - Instituto de Hypodermia e Farmácia Ltda., Ribeirão das Neves, MG, Brasil) via intraperitoneal, na dose de 60mg/kg uma vez ao dia.

Todos os antibióticos foram administrados por 15 dias. O grupo PA de 36 dias recebeu via intraperitoneal, 1ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (Sorimax, Farmax - Distribuidora Amaral Ltda., Divinópolis, MG, Brasil) para simular o mesmo estresse dos outros animais já o grupo PA de 21 dias, não recebeu nenhum tipo de tratamento.

3.3 Indução da PA

A PA foi induzida por meio da exposição pulpar empregando uma broca de aço carbono (Broca Ln CA 28mm, Long Neck, Maillefer, Dentsply, Tulsa, Ok, USA) dotada de uma esfera na extremidade com 0,1mm de diâmetro (Cintra et al., 2014). A exposição pulpar foi realizada no primeiro molar inferior do lado direito. As polpas ficaram expostas por 36 dias, sendo que a antibioticoterapia se iniciou no vigésimo primeiro dia de exposição pulpar, perdurando até o momento da eutanásia dos animais. Este delineamento permitiu observar o efeito da antibioticoterapia sistêmica na PA já estabelecida. Foi realizada a eutanásia de um grupo PA aos 21 dias, para que pudessemos saber como as lesões estavam nesse período, servindo como um controle inicial.

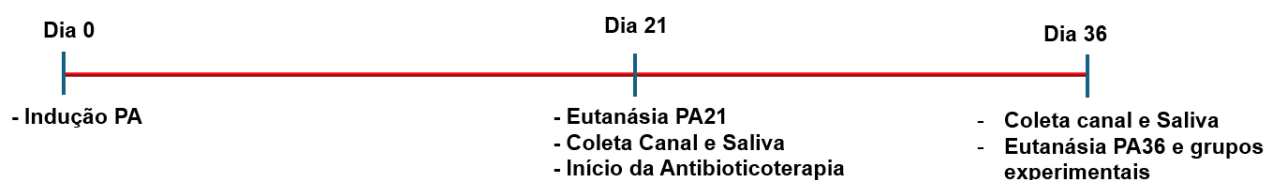


Figura 1 Linha do tempo dos períodos de indução, antibioticoterapia e eutanásia

3.4 Grupos experimentais

Os 56 ratos foram divididos em 7 grupos com 8 animais cada, de acordo com o tipo de droga a ser administrada:

- PA21: Grupo Controle inicial com PA de 21 dias
- PA36: Grupo Controle final com PA de 36 dias e tratado por 15 dias com Cloreto de sódio 0,9%
- AMO: Grupo com PA tratado por 15 dias com Amoxicilina;
- MET: Grupo com PA tratado por 15 dias com Metronidazol;
- AMP: Grupo com PA tratado por 15 dias com Ampicilina;
- AM+C: Grupo com PA tratado por 15 dias com Amoxicilina associada ao Clavulanato de potássio;
- CLI: Grupo com PA tratado por 15 dias com Clindamicina.

3.5 Eutanásia e processamento laboratorial

Os animais foram eutanasiados conforme protocolo descrito anteriormente, e as mandíbulas foram removidas e fixadas em formalina a 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) tamponada com pH neutro nas primeiras 20 horas. Em seguida, foram lavadas com água corrente por 12 horas. Após a fixação, os espécimes foram desmineralizados em solução de EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) por aproximadamente 3 meses. Na sequência, foram lavadas com água corrente, 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 cortes teciduais foram obtidos em micrótomo (RM 2045, Leica do Brasil Importação e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil), com espessura de 3µm. Foram montadas 3 lâminas starfrost (Knittel Glasbearbeitungs, Braunschweig, Germany) com três cortes teciduais para cada espécime que foram corados com H&E, Picrosirius Red e Brown e Brenn, e outras cinco lâminas, com três cortes cada, que foram utilizadas para a

técnica de imunoistoquímica para a determinação do perfil inflamatório, por meio dos marcadores CD4, CD8, CD20, CD45 e CD57.

Para a técnica da imunoistoquímica, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em etanol. A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão Diva Decloaker® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada Decloaking Chamber® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Ao término de cada uma das etapas da reação imunoistoquímica, foi efetuada a lavagem em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4. Os cortes histológicos foram imersos em 3% de peróxido de hidrogênio (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, SP Brasil) por 1 hora e em 1% de soro albumina bovino por 12 horas, para o bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas histológicas foram submetidas à incubação com seus respectivos anticorpos primários diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes, foi empregado o Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA). As secções histológicas foram incubadas com anticorpo secundário biotinilado durante 2 horas, e posteriormente tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Na revelação, foi empregado, como cromógeno, o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA) e, em seguida, a contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

3.6 Forma de Análise dos Resultados

- Análise histológica

A análise histológica foi realizada por um investigador cego e calibrado para caracterização do perfil inflamatório das lesões periapicais (Cintra et al., 2014). As lâminas com os cortes de cada espécime foram observadas por microscopia óptica e utilizadas para a análise descritiva, que consistiu na descrição dos fenômenos histopatológicos. A análise qualitativa foi realizada por meio da atribuição de escores

para o critério infiltrado inflamatório. A intensidade do processo inflamatório foi analisada em conformidade com o número médio aproximado de células inflamatórias presentes em diferentes campos de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400x, junto ao periápice dentário:

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

- Análise histométrica

A análise histométrica foi realizada por um investigador cego e calibrado em todos os grupos para comparar a perda óssea periapical da PA. Foi empregado o software Leica LAS 4.12 (Leica Microsystems, Nussloch – Germany) e os valores foram expressos em micrometro quadrado (μm^2), obtidos em medidas de área (Cintra et al., 2014).

- Análise imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica foi realizada sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão) por um investigador cego e calibrado. A imunomarcagem foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no citoplasma das células e/ou na matriz extracelular. Para análise imunoistoquímica dos marcadores CD4, CD8, CD20, CD45 e CD57, foi considerado o número de células positivas calculadas no perímetro apical padronizado e expresso em células/ μ . A análise foi realizada pela contagem de células imunomarcadas por campo, em um aumento de 1000x em quatro regiões diferentes da lesão ao redor do periápice dentário (Azuma et al. 2018).

- Análise de maturação colágena

Para análise das fibras colágenas, os cortes corados com picrosirius red foram analisados sob microscopia de luz polarizada, com objetivo de identificar as fibras maduras e imaturas (Terayama et al., 2020; Cintra et al., 2017). Na região da

lesão próxima ao ápice radicular, foi realizada a seleção de cor para cada tipo de fibra colágena. Após a seleção das cores, o software Leica LAS 4.12 (Leica Microsystems, Nussloch – Germany) foi utilizado para realizar o cálculo da área demarcada com cada tipo de fibra colágena. Foi considerado fibras maduras e espessas as de cores vermelho-amareladas, e fibras imaturas e finas as de cores verde-amareladas (Junqueira et al., 1982).

- Análise da extensão da contaminação do canal radicular

A análise bacteriológica da extensão da contaminação foi realizada por um investigador cego e calibrado por meio da coloração de Brown e Brenn para detecção de bactérias gram-positivas e gram-negativas nos diferentes terços do canal radicular sob a forma de escores (Faria et al., 2024):

Score 0: Ausência de bactérias;

Score 1: Presença de bactérias no terço cervical da raiz

Score 2: Presença de bactérias no terço médio da raiz

Score 3: Presença de bactérias no terço apical da raiz, com exceção do forame apical;

Score 4: Presença de bactérias no terço apical da raiz, incluindo o forame.

- Análise Bacteriológica da saliva e canal radicular

A análise bacteriológica foi realizada para verificar o perfil microbiológico da saliva e do canal radicular antes e após a antibioticoterapia. A coleta das amostras da saliva foi realizada em dois momentos no 21º dia de experimento (antes do início da antibioticoterapia) e no 36º de experimento (fim da antibioticoterapia).

A coleta da saliva foi realizada com um microbrush estéril, que foi colocado por 60 segundos na mucosa sublingual dos animais. A ponta do microbrush foi cortada com alicates estéril e colocada em um tubo de microcentrífuga contendo solução de ringer. Em seguida, a coroa e a câmara pulpar foram desinfetadas (Jacinto et al., 2008), para a coleta do canal radicular, utilizando um método adaptado de Jacinto et al. (2008). Uma lima tipo K #10 foi introduzida no canal distal dos molares inferiores dos ratos em uma profundidade de 6 mm, e mantida na posição por 60 segundos. Em

seguida, a ponta da lima foi cortada e a lima foi colocada em um tubo de microcentrifuga contendo solução de ringer. Imediatamente após a coleta, as amostras foram levadas para o laboratório para análise de cultura por um investigador cego e calibrado.

As amostras de saliva e do canal foram agitadas por 60 segundos em vórtex (Vortex; Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Diluições seriadas de até 10^{-4} foram feitas em tubos contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI; Difco Laboratories Inc., Detroit, EUA). Cinquenta μ l dessas diluições seriadas foram semeadas em ágar BHI suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado (BHI; Difco) para cultura não seletiva de anaeróbios estritos e anaeróbios facultativos. As placas foram incubadas anaerobicamente a 37 °C por 14 dias. Além disso, 50 μ L de cada amostra foram plaqueados em meios de cultura seletivos: ágar Mitis Salivarius para *Streptococcus* spp. e ágar Sabouraud para fungos (OXOID, Basingstoke, Reino Unido), incubados aerobicamente a 37°C por 48 h. As unidades formadoras de colônias (UFC/ml) foram contadas e utilizadas para análise estatística.

- Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa SigmaPlot 12.0™ (Chicago, IL, USA). A verificação da distribuição normal das variáveis contínuas quantitativas foi feita pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. As variáveis que apresentaram distribuição normal foram expressas em média e desvio padrão e aquelas que apresentaram distribuição não normal foram expressas em mediana.

Para os valores quantitativos das análises que seguiram distribuição normal foram aplicados o teste ANOVA, enquanto para comparações múltiplas dos resultados entre os grupos estudados, foi utilizado o teste Tukey. Para as análises por score e para os valores quantitativos que não seguiram distribuição normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, e quando observada alguma diferença significativa, foi realizado o cruzamento entre os grupos, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn (Dunn, 1958).

Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade foi menor 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

Análise do Infiltrado Inflamatório

Na análise do infiltrado inflamatório (Tabela 1) o grupo PA21 apresentou infiltrado inflamatório predominante moderado, apresentando diferença estatística apenas quando comparado ao grupo PA36 dias ($p < 0,05$), que apresentou infiltrado inflamatório predominantemente intenso. Por outro lado, os grupos que receberam amoxicilina e amoxicilina associada ao clavulanato de potássio apresentaram infiltrado inflamatório predominantemente moderado, porém, sem diferença para nenhum grupo ($p > 0,05$). Os grupos que receberam metronidazol e ampicilina, apresentaram infiltrado inflamatório entre moderado e intenso e o grupo que recebeu clindamicina teve predominância de infiltrado inflamatório intenso. Nenhum grupo de tratamento apresentou diferenças estatísticas entre si e em relação ao grupo controle de 36 dias ($p > 0,05$).

Análise Histométrica

Na análise histométrica foi mensurado a perda óssea periapical que determina o tamanho das lesões periapicais (Tabela 1). O grupo PA21 apresentou as menores áreas de lesão periapical ($74,93 \pm 7,16 \mu\text{m}$) e diferiu de todos os grupos ($p < 0,05$), com exceção dos grupos AMO ($83,45 \pm 8,99$) e AM+C ($83,72 \pm 8,10$), sendo que esses dois grupos apresentaram menor perda óssea em relação ao grupo PA36 ($106,96 \pm 13,70$) e CLI ($101,92 \pm 9,54$) ($p < 0,05$), e não apresentaram diferença em relação ao grupo MET ($88,84 \pm 3,90$) e AMP ($89,89 \pm 3,57$) ($p > 0,05$). O Grupo MET apresentou menor perda óssea em relação aos grupos PA36 e CLI ($p < 0,05$), já o grupo AMP apresentou menor perda óssea apenas comparado ao grupo PA36 ($p < 0,05$). O grupo CLI foi o único que não apresentou diferença em relação ao grupo PA36 ($p > 0,05$).

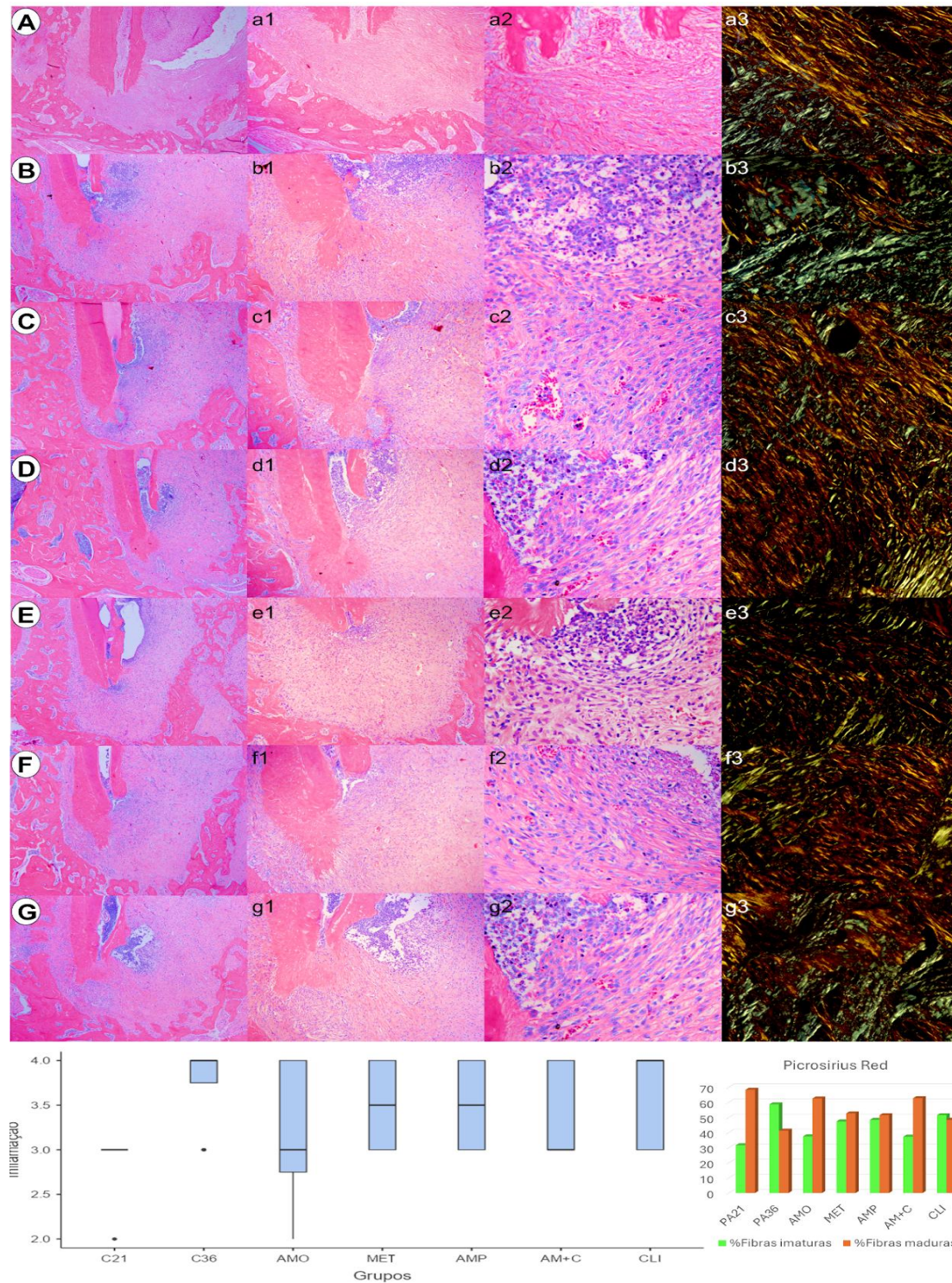


Figura 2 - Cortes histológicos representativos corados em H&E em aumentos originais de 50x (A-G), 100x (a1-g1) e 400x (a2-g2) e corados em Picrosirius Red em aumentos originais de 400x (a3-g3). Os grupos PA21, PA36, AMO, MET, AMP, AM+C e CLI estão representados pelas letras A, B, C, D, E, F, G, respectivamente. Gráfico de caixa comparando a mediana da inflamação dos grupos e gráfico de barras comparando a média de fibras maduras e imaturas de cada grupo.

Tabela 1 – Escores e mediana da intensidade do infiltrado inflamatório e média do tamanho das lesões periapicais de cada grupo.

Parâmetros Histológicos	Escore	Grupos							Valor de p
		PA21	PA36	AMO	MET	AMP	AM+C	CLI	
Intensidade do infiltrado inflamatório	1	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	Kruskal–Wallis p=0.015
	2	2/8	0/8	2/8	0/8	0/8	0/8	0/8	
	3	6/8	1/8	3/8	4/8	4/8	5/8	3/8	
	4	0/8	7/8	3/8	4/8	4/8	3/8	5/8	
	Mediana *	3 ^a	4 ^b	3 ^{ab}	3.5 ^{ab}	3.5 ^{ab}	3 ^{ab}	4 ^{ab}	
Tamanhos das lesões periapicais		74.93 ±	106.96 ±	83.45 ±	88.84 ±	89.89 ±	83.72 ±	101.92 ±	ANOVA
(x10 ⁴ µm ² ± DP) *		7.16 ^a	13.70 ^b	8.99 ^{ac}	3.90 ^c	3.57 ^{cd}	8.10 ^{ac}	9.54 ^{bd}	p<0.001

* Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas nas linhas ($p < 0,05$)

Análise Imunoistoquímica

Na análise imunoistoquímica para CD4, os grupos PA21 (35,4 ± 5,93), AMO (25,25 ± 3,77), AM+C (29,5 ± 7,03), MET (34,12 ± 13,97) e AMP (33 ± 11,86) apresentaram menor quantidade de células imunomarcadas em relação ao grupo PA36 (52,1 ± 6,20). Na análise para CD45, os grupos PA 21 (45,06 ± 8,85), AMO (44,25 ± 20,68) e AM+C (43,12 ± 16,73) apresentaram uma menor imunomarcção em relação ao PA36 (72,1 ± 16,87). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos na análise imunoistoquímica para CD8, CD20 e CD57 (p>0,05).

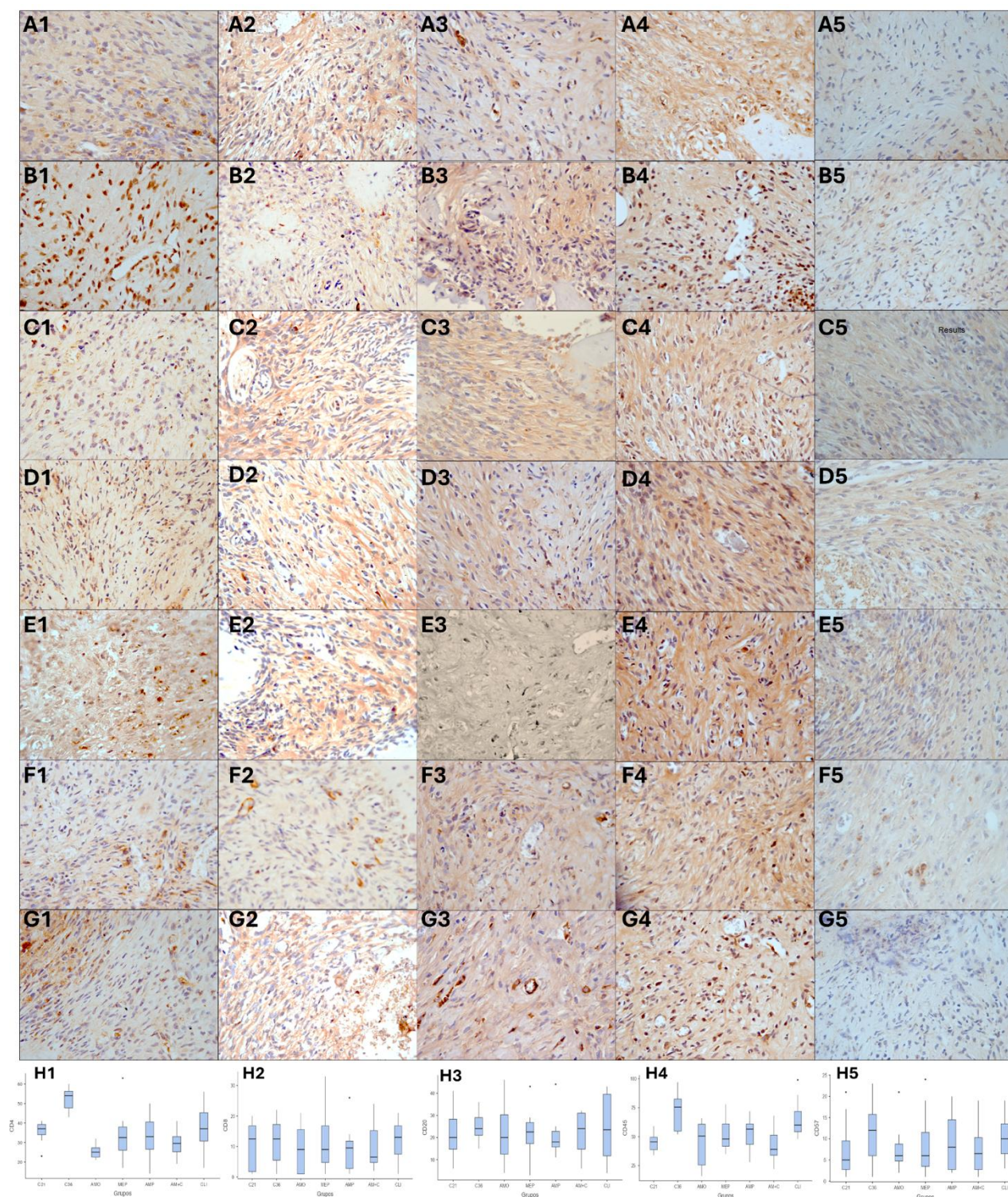


Figura 3 - Cortes histológicos representativos da imunoistoquímica em aumento de 400x para CD4 (A1-G1), CD8 (A2-G2), CD20 (A3-G3), CD45 (A4-G4) e CD57 (A5-G5). Os grupos PA21, PA36, AMO, MET, AMP, AM+C e CLI estão representados pelas letras A, B, C, D, E, F, G, respectivamente. Gráfico de caixa comparando a média da imunomarcagem de CD4, CD8, CD20, CD45 e CD57 (H1-H5) de todos os grupos.

Tabela 2 – Média de células imunomarcadas para cada marcador nos diferentes grupos.

GRUPOS	Imunomarcadores (Média ± desvio padrão)				
	CD4	CD8	CD20	CD45	CD57
PA21	35,4 ± 5,93 ^a	10,5 ± 08,09 ^a	21,62 ± 11,39 ^a	45,06 ± 08,85 ^a	07,62 ± 7,37 ^a
PA36	52,1 ± 6,20 ^b	11,37 ± 07,80 ^a	24,875 ± 06,42 ^a	72,1 ± 16,87 ^b	11,37 ± 07,48 ^a
AMO	25,25 ± 3,77 ^a	09,25 ± 07,89 ^a	21,87 ± 13,98 ^a	44,25 ± 20,68 ^a	07,87 ± 05,96 ^a
MET	34,12 ± 13,97 ^a	12,25 ± 11,45 ^a	22,12 ± 11,96 ^a	52,00 ± 17,78 ^{ab}	08,87 ± 08,31 ^a
AMP	33,00 ± 11,86 ^a	09,50 ± 08,19 ^a	20,87 ± 10,44 ^a	52,30 ± 15,67 ^{ab}	09,12 ± 06,90 ^a
AM+C	29,50 ± 7,03 ^a	10,12 ± 07,95 ^a	21,87 ± 09,93 ^a	43,12 ± 16,73 ^a	07,62 ± 06,23 ^a
CLI	37,90 ± 12,54 ^{ab}	12,12 ± 06,85 ^a	24,62 ± 15,11 ^a	65,62 ± 18,03 ^{ab}	10,5 ± 05,76 ^a
Valor de p	<0,001	= 0,988	= 0,972	< 0,017	= 0,9121

* Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas nas colunas ($p < 0,05$)

Análise das Fibras colágenas

Na análise de maturação das fibras colágenas, o grupo PA21 (31,64 ± 17,49) apresentou menor quantidade de fibras imaturas em comparação ao grupo PA36 (58,72 ± 10,40) ($p < 0,05$). Os demais grupos não apresentaram diferença na quantidade de fibras imaturas ($p > 0,05$). Na comparação da quantidade de fibras maduras o grupo PA21 (68,36 ± 17,49), apresentou uma maior quantidade de fibras maduras em relação ao grupo PA36 (41,28 ± 10,40) ($p < 0,05$). Os demais grupos não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Tabela 3 - Porcentagens de fibras colágenas e desvio padrão (DP) de acordo com o grupo

Grupos	Fibras Imaturas (%± DP)	Fibras Maduras (%± DP)
PA21	31,64 ± 17,49 ^a	68,36 ± 17,49 ^a
PA36	58,72 ± 10,40 ^b	41,28 ± 10,40 ^b
AMO	37,46 ± 9,80 ^{ab}	62,54 ± 10,56 ^{ab}
MET	47,35 ± 15,16 ^{ab}	52,65 ± 15,16 ^{ab}
AMP	48,45 ± 17,95 ^{ab}	51,55 ± 17,95 ^{ab}
AM+C	37,29 ± 11,40 ^{ab}	62,71 ± 11,40 ^{ab}
CLI	51,53 ± 14,48 ^{ab}	48,47 ± 14,48 ^{ab}
Valor de p	=0.005	=0.005

* Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas nas colunas ($p < 0,05$)

Análise da extensão da contaminação do canal radicular

Na análise da presença de microrganismos nos diferentes terços do canal radicular, todos os grupos apresentaram microrganismos no terço apical do canal, com envolvimento do forame apical.

Tabela 4. Escores e mediana da presença de bactérias por terços do canal radicular

Análise Bacteriológica	Escore	Valor de p							
		PA 21	PA 36	AMO	MET	AMP	AM+C	CLI	
Presença de bactérias	0	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	Kruskal–
	1	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	
	2	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	
	3	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	Wallis
	4	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	
	Mediana *	4 ^a	4 ^a	4 ^a	4 ^a	4 ^a	4 ^a	4 ^a	p = 1,00

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

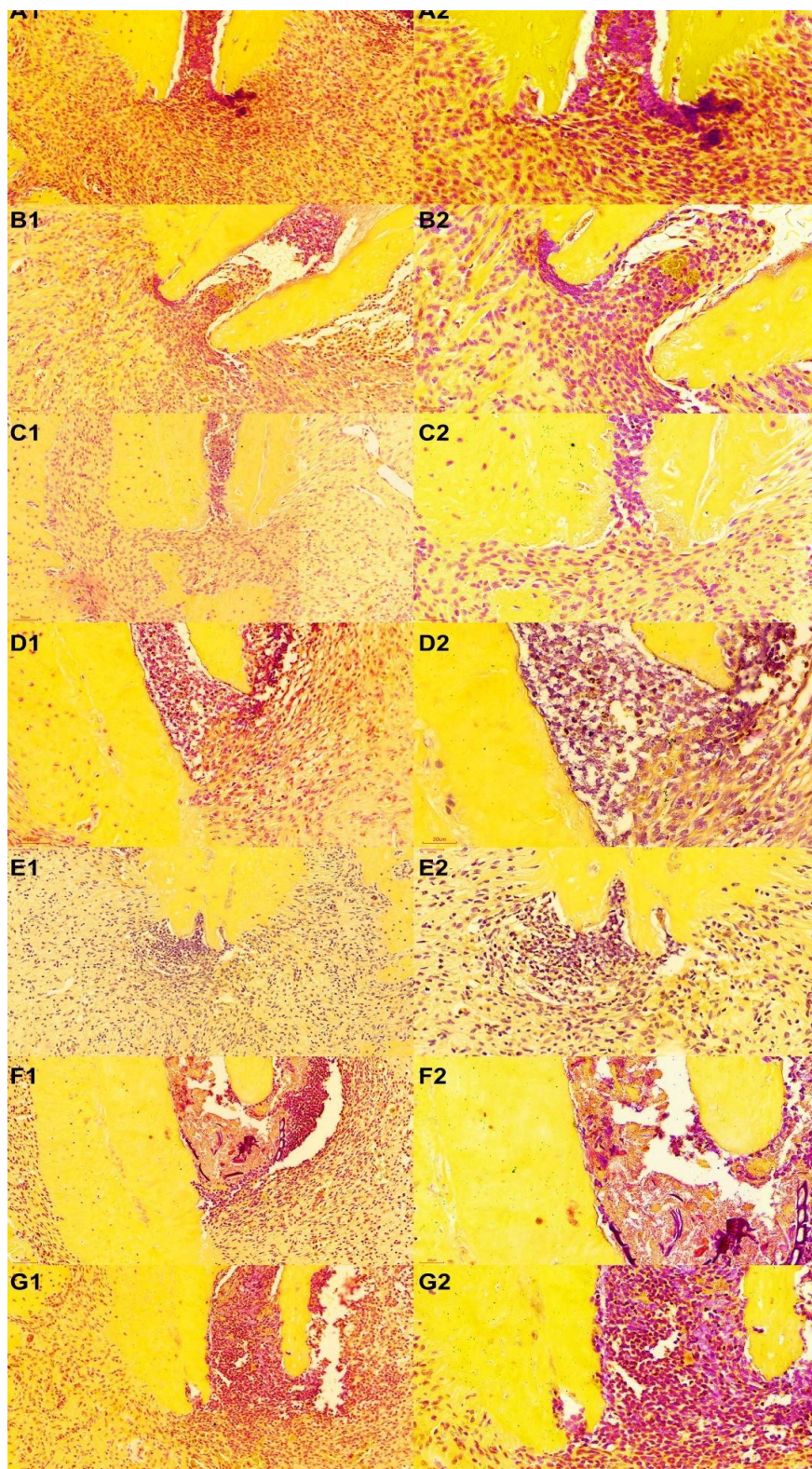


Figura 4 - Cortes histológicos representativos corados em Brown e Brenn em aumentos de 200x (A1-G1), 400x (A2-G2) e 400x (a2-g2). Os grupos PA21, PA36, AMO, MET, AMP, AM+C e CLI estão representados pelas letras A, B, C, D, E, F, G, respectivamente.

Análise Bacteriológica da saliva e canal radicular

A administração sistêmica de antibióticos promoveu diminuição significativa na carga microbiana salivar nos grupos tratados com amoxicilina isolada ou em combinação com ácido clavulânico ($p < 0,05$). Contudo, não foram identificadas diferenças na quantificação de *Streptococcus* spp. e fungos entre os diferentes grupos ($p > 0,05$). A Tabela 5 apresenta os valores médios e desvios padrão das contagens microbianas de UFCs nas amostras de saliva coletadas aos 21 e 36 dias após a indução da lesão periapical, correspondendo aos períodos pré e pós-antibioticoterapia.

Tabela 5 - Média e desvio-padrão da contagem de UFCs na saliva aos 21 e 36 dias.

Saliva	Anaeróbios		Streptococcus		Fungos	
	21Dias	36Dias	21Dias	36Dias	21Dias	36Dias
PA36	$2,8 \times 10^3$ (1,8 $\times 10^3$)	$3,5 \times 10^3$ (1,5 $\times 10^3$)	$2,6 \times 10^3$ (2,9 $\times 10^3$)	$2,6 \times 10^3$ (1,2 $\times 10^3$)	$1,9 \times 10^1$ (3,7 $\times 10^1$)	$6,2 \times 10^0$ (1,8 $\times 10^1$)
AMO	$3,4 \times 10^3$ (2,9 $\times 10^3$)	4×10^2 (5,8 $\times 10^2$) *	$2,1 \times 10^3$ (2,6 $\times 10^3$)	$5,2 \times 10^2$ (1 $\times 10^3$)	$4,3 \times 10^1$ (8,6 $\times 10^1$)	0 (0)
MET	$3,4 \times 10^3$ (2 $\times 10^3$)	$3,5 \times 10^3$ (3,7 $\times 10^3$)	$2,4 \times 10^3$ (1,9 $\times 10^3$)	4×10^3 (4,5 $\times 10^3$)	$6,2 \times 10^0$ (1,8 $\times 10^1$)	$1,2 \times 10^1$ (3,5 $\times 10^1$)
AMP	$1,7 \times 10^3$ (9,4 $\times 10^2$)	$2,7 \times 10^3$ (4,2 $\times 10^3$)	$3,7 \times 10^3$ (3 $\times 10^3$)	1×10^3 (8,6 $\times 10^2$)	0 (0)	$4,4 \times 10^1$ (5,6 $\times 10^1$)
AM+C	$2,3 \times 10^3$ (1,9 $\times 10^3$)	$3,8 \times 10^2$ (5,7 $\times 10^2$) *	$1,9 \times 10^3$ (1,4 $\times 10^3$)	$4,8 \times 10^2$ (5 $\times 10^2$)	$1,2 \times 10^1$ (3,5 $\times 10^1$)	$2,5 \times 10^1$ (5,3 $\times 10^1$)
CLI	$1,9 \times 10^3$ (8,9 $\times 10^2$)	$1,1 \times 10^3$ (7,8 $\times 10^2$)	$2,3 \times 10^3$ (1,5 $\times 10^3$)	$7,4 \times 10^2$ (6 $\times 10^2$)	0 (0)	$2,1 \times 10^2$ (4,5,5 $\times 10^2$)
Valor de p	<0,05		>0,05		>0,05	

* Asterisco indicam diferenças estatisticamente significativas nas colunas ($p < 0,05$)

A Tabela 6 descreve os dados referentes às amostras obtidas dos canais radiculares nos mesmos intervalos experimentais.

Tabela 6 – Média e desvio padrão da contagem de UFCs nos canais radiculares nos diferentes grupos

Canal	Anaeróbios	Streptococcus	Fungos
PA21	2.6X10 ³ (3.4 X10 ³) ^a	4.5X10 ³ (6 X10 ³) ^a	0 ^a
PA36	1.3X10 ³ (2.2 X10 ³) ^a	8.1X10 ² (8.1 X10 ²) ^a	0 ^a
AMO	3X10 ² (1.8 X10 ²) ^a	2.6X10 ² (2.6 X10 ²) ^a	0 ^a
MET	1.2X10 ³ (1.4 X10 ³) ^a	4X10 ² (7.2 X10 ²) ^a	0 ^a
AMP	1.4X10 ³ (1.1 X10 ³) ^a	4.8X10 ² (7.2 X10 ²) ^a	0 ^a
AM+C	1.3X10 ³ (1.3 X10 ³) ^a	8X10 ² (1.4 X10 ³) ^a	0 ^a
CLI	3.5X10 ² (4.3 X10 ²) ^a	7.2X10 ² (1 X10 ³) ^a	0 ^a
Valor de p	>0,05	>0,05	>0,05

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas nas colunas ($p < 0,05$)

5 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi verificar a influência da antibioticoterapia sistêmica no perfil inflamatório e reabsortivo da PA, na maturação colágena da PA, na contaminação do canal radicular, assim como sua influência sobre a microbiota salivar e do canal radicular em Ratos Wistar. A análise do perfil inflamatório foi realizada através da análise histológica em coloração de H&E e pelos imunomarcadores CD4, CD8, CD20, CD45 e CD57. A análise do perfil reabsortivo foi realizado através da análise histométrica em coloração de H&E. A análise da maturação colágena da PA foi realizada através da coloração de picrosírius red. A extensão da contaminação do canal radicular foi verificada através da coloração de Brown e Brenn. Por fim, foi

realizada a análise da carga microbiana de anaeróbios *Streptococcus ssp.* e fungos no canal radicular e na saliva.

A antibioticoterapia sistêmica não alterou a intensidade da resposta inflamatória da PA, mas foi capaz de modular a quantidade de algumas células inflamatórias, identificadas por imunomarcadores específicos. Os grupos que receberam amoxicilina, ampicilina, metronidazol e amoxicilina associada ao clavulanato de potássio apresentaram menor imunomarcagem para CD4 em relação ao controle de 36 dias, enquanto os grupos amoxicilina e amoxicilina associada ao clavulanato, apresentaram menor imunomarcagem de CD45 em relação ao controle de 36 dias.

Com relação à perda óssea periapical, os ratos que receberam amoxicilina, metronidazol, ampicilina e amoxicilina associada ao clavulanato de potássio apresentaram lesões periapicais menores comparadas ao controle de 36 dias, mostrando que os antibióticos retardaram a progressão da lesão.

Na análise em picrosirius red observou-se que os grupos tratados que apresentaram menor perda óssea, também exibiram maior proporção de fibras colágenas maduras (vermelhas/alaranjadas), em contraste com o grupo controle de 36 dias, no qual predominou a presença de fibras imaturas (verdes). Esse achado sugere que a menor intensidade inflamatória favoreceu a organização e maturação do colágeno, contribuindo para a estabilidade do tecido conjuntivo periapical. Sabe-se que a inflamação crônica está associada à degradação da matriz extracelular e ao predomínio de fibras imaturas, enquanto a resolução do processo inflamatório cria condições para a deposição de colágeno mais organizado e resistente, o que se relaciona diretamente à reparação tecidual. Resultados semelhantes foram observados no trabalho de Andrada et al., 2020, onde os grupos tratados com antibiótico e que apresentaram menor perda óssea, também apresentaram maturação do tecido de granulação, incluindo fibroblastos e fibras colágenas densas.

No presente estudo a antibioticoterapia sistêmica não alterou o perfil microbiológico do interior canal radicular, assim como não foram capazes de reduzir a extensão da contaminação de microrganismo no interior do canal radicular em sentido apical.

O período experimental do presente estudo foi de 36 dias. A indução da PA foi realizada no primeiro dia do experimento. A antibioticoterapia sistêmica foi iniciada após 21 dias, uma vez que este intervalo é considerado suficiente para o estabelecimento de lesões periapicais. Sabe-se que a fase mais ativa da reabsorção óssea é até os 15 dias e, aos 21 dias, a inflamação já está predominantemente na fase crônica (Stashenko et al., 1994). Portanto, os efeitos do tratamento antimicrobiano foram avaliados sobre uma inflamação crônica, simulando com maior fidelidade a progressão clínica da doença. Assim, foi possível observar o efeito do antibiótico na lesão estabelecida e não apenas durante a sua progressão, como em nosso estudo anterior (Faria et al., 2024).

A dosagem e a via de administração do antibiótico utilizado neste estudo foram definidas com base na literatura, seguindo protocolos experimentais previamente utilizados nos quais as doses não foram tóxicas aos animais. Optou-se pela via intraperitoneal por permitir controle mais preciso da dose administrada, garantindo maior reprodutibilidade dos resultados e minimizando variações na quantidade de medicamento recebido pelo animal, que poderiam ocorrer com outras vias, como quando administrado na água de beber. Para a Amoxicilina e Amoxicilina associado ao Clavulanato de potássio a dose de 100 mg/kg (Goodwani et al., 2015), para a Ampicilina a dose de 100 mg/kg (Rao et al., 2015), para o Metronidazol a dose de 40mg/kg (Al-Alami et al., 2016) e para a Clindamicina a dose de 60 mg/kg (Davey et al., 1987).

A amoxicilina é um antibiótico de amplo espectro e eficaz contra uma variedade de micro-organismos comumente envolvidos em infecções endodônticas (Cheng et al., 2018; Lang et al., 2016). A amoxicilina associada ao ácido clavulânico tem seu espectro de atuação ampliado, já que esse composto atua como inibidor das β -lactamases, enzimas produzidas por certas bactérias que oferecem resistência à amoxicilina (Lang et al., 2016; Oberoi et al., 2015).

Em um estudo anterior, a amoxicilina sozinha ou associada ao clavulanato de potássio reduziram a progressão da PA, diminuindo a intensidade do infiltrado inflamatório, o tamanho das lesões e retardando a progressão de microrganismo para o interior do canal radicular (Faria et al., 2024). No entanto, neste estudo,

antibioticoterapia foi iniciada no mesmo dia da indução da PA, momento em que a polpa não se apresentava necrosada, permitindo possivelmente que o antibiótico chegasse no interior do canal radicular, o que não ocorreu no presente trabalho, onde a administração foi iniciada com a lesão já estabelecida. Nesse caso, foi possível observar que a antibioticoterapia sistêmica não impediu a progressão de microrganismos para o interior do canal radicular e também não alterou o número de unidades formadoras de colônia na coleta do canal.

A Amoxicilina e a amoxicilina associada ao ácido clavulânico reduziram significativamente as cargas bacterianas anaeróbicas na saliva. Esses achados reforçam o entendimento de que a eficácia dos antibióticos sistêmicos em infecções endodônticas é limitada a áreas com vascularização adequada, como tecidos produtores de saliva e mucosa circundante, e tem pouco impacto no ambiente necrótico e avascular dos canais radiculares infectados (Segura-Egea et al., 2017; Ricucci & Siqueira, 2010). A modulação observada da microbiota salivar por regimes à base de amoxicilina também destaca os potenciais efeitos colaterais dos antibióticos sistêmicos no ecossistema oral mais amplo, que podem influenciar a recolonização microbiana, a disbiose e a resistência a antibióticos (Zaura et al., 2015).

A redução da contagem de bactérias anaeróbicas na saliva observada nos grupos amoxicilina e amoxicilina associada ao ácido clavulânico pode ser atribuída à sua atividade de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e anaeróbicas, bem como à sua absorção sistêmica e difusão tecidual eficazes. A amoxicilina, um antibiótico β -lactâmico, atinge altas concentrações salivares devido à sua boa biodisponibilidade oral e distribuição nas glândulas salivares, permitindo-lhe modular as populações microbianas nesse nicho (Baglie et al., 2007; Zaura et al., 2015).

Por outro lado, os grupos que receberam antibiótico, com exceção da clindamicina, apresentaram lesões menores, em comparação ao grupo controle de 36 dias. Este achado pode estar relacionado com o perfil inflamatório verificado na análise imunoistoquímica.

Apesar de não terem sido observadas diferenças expressivas no perfil inflamatório entre os grupos, os animais tratados com antibióticos apresentaram menor perda óssea, sugerindo que o efeito da antibioticoterapia pode estar mais

relacionado à modulação funcional da resposta inflamatória do que à redução quantitativa das células infiltradas. É possível que os antibióticos atuem em vias moleculares associadas à produção de citocinas pró-reabsorptivas, dessa forma, mesmo sem alterar de forma significativa a densidade celular do infiltrado inflamatório, o antibiótico pode ter promovido modulação indireta da resposta, reduzindo a expressão de mediadores inflamatórios e, consequentemente, atenuando o processo de reabsorção óssea associado à periodontite apical.

Em relação a análise imunoistoquímica, foram selecionados marcadores que cobrissem tanto a resposta imune inata quanto a resposta imune adaptativa. A resposta imune inata é a resposta primária a patógenos e seus produtos, utilizando da defesa não específica para oferecer uma proteção imediata (Ma et al., 2023). Na região periapical, as células que estão envolvidas nessa resposta inicial, são as células apresentadoras de antígeno (Monócitos, macrófagos e células dendríticas), mastócitos, neutrófilos e células NK (Wen et al., 2024; Galler et al., 2021).

As células T CD4⁺ estão presentes em grande quantidade e são responsáveis por regular a resposta imunológica e ativar diversas funções biológicas de outros tipos celulares (Braz-Silva et al., 2019). Estas células também são responsáveis pela ativação e diferenciação de Células B em células plasmáticas que são responsáveis pela produção de anticorpos contra antígenos, além de neutralizar toxinas (Cyster & Allen, 2019). As Células B têm grande participação na produção de RANKL, que é responsável pela reabsorção óssea (Kawai et al., 2006).

Na PA, os diferentes subconjuntos de células T auxiliares (Th) exercem papéis específicos na modulação da resposta imune no microambiente inflamatório. Os subconjuntos Th1 e Th17 se destacam por sua forte atuação na mediação dos processos inflamatórios. As células Th1 são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , que induzem a polarização de macrófagos para o fenótipo M1, contribuindo para a perpetuação da inflamação (Colavite et al., 2019; Orecchioni et al., 2019). Já as células Th17 secretam IL-17, promovendo o recrutamento e a ativação de neutrófilos, o que intensifica a resposta inflamatória local (Eskan et al., 2012). Dessa forma, a presença desses subconjuntos Th evidencia o papel central das células T CD4⁺ na patogênese da PA (Cavalla et al., 2021).

Neste trabalho, os grupos que receberam antibióticos, com exceção da clindamicina, apresentaram uma imunomarcagem para CD4, e consequentemente apresentaram menor perda óssea em relação ao grupo controle de 36 dias, mostrando que os antibióticos tiveram a capacidade de regular a resposta das células T CD4+.

O marcador CD57, possibilitou observar a presença de células NK, uma das principais células da resposta imune inata. No entanto, não houve diferença na quantidade de imunomarcagem entre os grupos e houve uma menor quantidade dessas células em relação as demais. Possivelmente, isso ocorreu por se tratar de células que atuam principalmente no início da resposta inflamatória, na defesa primária, as quais vão reduzindo de acordo com a progressão da doença.

Os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) exercem papel central na imunidade adaptativa, sendo responsáveis pela eliminação de células infectadas por patógenos intracelulares, como vírus, e pelo reconhecimento e destruição de células neoplásicas. Sua atividade efetora ocorre principalmente pela liberação de grânulos citotóxicos, como perforina e granzimas, que promovem apoptose das células-alvo (Hersperger, 2010). Além disso, os CD8⁺ contribuem para a ativação de fagócitos e para a amplificação da inflamação local, integrando-se a diferentes vias da resposta imune celular (Lorenzi, Barbosa, & Lorenzi, 2012).

Os linfócitos T CD8⁺ desempenham papel importante na PA ao exercerem funções citotóxicas, eliminando células infectadas ou alteradas no tecido periapical (Wen et al., 2024). Embora estejam presentes em número menor quando comparados às células T CD4⁺, sua participação é consistente no infiltrado inflamatório, sugerindo uma atuação mais estável e relacionada à vigilância imunológica (Cisterna et al., 2008, Joshi and Kaech, 2008). Além disso, mesmo em condições de imunossupressão, como em pacientes HIV+ sob terapia antirretroviral, os níveis de CD8⁺ não sofrem alterações significativas, reforçando seu papel de vigilância constante e manutenção da resposta imune adaptativa nas lesões apicais (Gama et al., 2016).

Neste estudo, não houve diferença significativa na imunomarcagem para CD20, que é o marcador de Linfócitos B, e que são os responsáveis pela produção de anticorpos contra antígenos, além de neutralizar suas toxinas (Cyster & Allen, 2019). Os linfócitos B necessitam ser ativados e diferenciados em células plasmáticas pelas

células T CD4⁺ (Braz-Silva et al., 2019). Assim, por mais que os grupos que receberam antibióticos não tenham apresentado números menores de linfócitos B, apresentaram menor número de células T CD4⁺ que são responsáveis pela sua ativação, podendo justificar também a menor reabsorção óssea, já que as células B são responsáveis pela produção de RANKL (Kawai et al., 2006).

Nos grupos tratados com antibióticos não foi observado menor intensidade inflamatória nos tecidos periapicais, no entanto, houve menor imunomarcagem de CD45, especialmente nos grupos tratados com amoxicilina e amoxicilina associada ao ácido clavulânico. Esse marcador é amplamente utilizado na identificação de células de origem hematopoiética, abrangendo praticamente todas as populações leucocitárias, como neutrófilos, monócitos e linfócitos, com exceção apenas de plaquetas e eritrócitos maduros, além de apresentar um importante papel na transdução de sinal do receptor de células T e do receptor de células B (Rheinländer et al., 2018).

Embora a análise do infiltrado inflamatório, realizada por meio de escores baseados em faixas de quantidade de células inflamatórias por campo, não tenha mostrado diferença significativa entre os grupos, a imunomarcagem para CD45 evidenciou que existe alguma diferença. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que a avaliação imunoistoquímica para CD45 foi realizada por contagem direta de células, proporcionando uma mensuração quantitativa mais precisa da resposta inflamatória. A diminuição da expressão de CD45 reflete diretamente na resposta inflamatória local, já que uma menor quantidade de células do sistema imune esteve presente no infiltrado tecidual.

Além da alteração na quantidade de células CD4⁺ e CD45⁺ é importante considerar que a ação dos antibióticos pode ir além da modulação celular, atingindo também vias moleculares envolvidas na resposta inflamatória. Andrada et al. (2020) demonstraram que a azitromicina, além de reduzir a perda óssea periapical, promoveu um microambiente anti-inflamatório caracterizado por maior infiltração de macrófagos M2, ao mesmo tempo em que suprimiu a ativação do NF- κ B induzida por patógenos endodônticos e reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 α . Por sua vez, a ampicilina levou a infiltrado inflamatório mais brando, ainda que

associado a maior quantidade de macrófagos M1, enquanto a amoxicilina não alterou a via do NF- κ B, mas foi capaz de modular a resposta inflamatória por meio da diminuição dos níveis de IL-1 α . Esses achados sugerem que os antibióticos podem exercer efeitos imunomoduladores complexos, influenciando tanto o perfil celular quanto a sinalização molecular no microambiente periapical, o que pode justificar, ao menos em parte, os resultados obtidos em nosso estudo.

O tempo de antibioticoterapia de 15 dias foi adotado com o objetivo de garantir uma exposição sistêmica prolongada ao fármaco, possibilitando avaliar não apenas seus efeitos antimicrobianos, mas também suas potenciais ações imunomoduladoras e reparadoras. Embora, em protocolos clínicos odontológicos, o uso de antibióticos geralmente se restrinja a 5 a 7 dias, a extensão do tratamento neste modelo experimental buscou permitir uma influência mais ampla sobre o microambiente inflamatório. Os efeitos imunomoduladores e de reparo tecidual em modelos de periodontite não são imediatos, exigindo um intervalo de tempo considerável para que possam ser plenamente observados histológica e imunoistoquimicamente.

Estudos experimentais em ratos demonstram que alterações significativas nos marcadores inflamatórios e no equilíbrio RANKL/OPG, bem como redução da atividade osteoclástica e reorganização do tecido conjuntivo, tornam-se evidentes somente após 15 dias de tratamento, com estabilização e maturação do reparo tecidual até 30 dias (Longo, 2015; Fernandes, 2010). De modo semelhante, o uso de terapias antibióticas e fotodinâmicas associadas demonstrou modulação imune e redução da perda óssea apenas a partir do 15º dia em modelos experimentais de periodontite em ratos, com resultados mais evidentes aos 30 dias (Faleiros, 2012). Portanto, a manutenção de protocolos terapêuticos com duração de pelo menos 15 dias é biologicamente coerente para permitir a manifestação dos efeitos imunomoduladores e reparativos, justificando o regime de antibioticoterapia adotado neste estudo.

Apesar dos resultados obtidos, é importante ressaltar que a compreensão completa dos mecanismos envolvidos na modulação da PA ainda demanda investigações adicionais. Em especial, estudos futuros devem buscar correlacionar as alterações celulares com a dinâmica de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-17,

que desempenham papéis centrais na ativação e manutenção do processo inflamatório. Da mesma forma, a avaliação de marcadores de reabsorção óssea, como RANK, RANKL e OPG, podem fornecer informações relevantes sobre o equilíbrio entre destruição e reparação tecidual. A integração desses parâmetros permitirá uma compreensão mais ampla da resposta do hospedeiro diante a administração de antibiótico de maneira sistêmica, além disso, é fundamental reconhecer a limitação inerente à análise histométrica, que permite apenas a mensuração bidimensional da área da lesão. Assim, torna-se indispensável a realização de análises microtomográficas, capazes de determinar o volume total da lesão periapical e fornecer uma avaliação tridimensional mais abrangente e precisa da extensão do processo patológico. Por fim, Esses resultados indicam um potencial efeito imunomodulador dos antibióticos, embora evidenciem também suas limitações, ressaltando a importância de estudos adicionais para esclarecer os mecanismos envolvidos e suas implicações terapêuticas.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que antibioticoterapia não impediu a progressão dos microrganismos para o interior do canal radicular, assim como não influenciou na carga microbiana do canal radicular, por outro lado, alterou a microbiota salivar, além disso, foi capaz de reduzir a reabsorção óssea, modulando a resposta inflamatória evidenciada pela redução de células CD4+ e CD45 e favoreceu a maturação das fibras colágenas.

7 Referências

1. AAS, J. A. *et al.* Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 11, p. 5721–5732, 2005. DOI: 10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005.
2. Al-Alami ZM, Shraideh ZA, Taha MO. Rosmarinic acid reverses the effects of metronidazole-induced infertility in male albino rats. *Reprod Fertil Dev.* 2017 Sep;29(10):1910-1920.
3. ALFENAS, C. F.; LINS, F. F.; MANESCHY, M. T.; UZEDA, M. Antibiotics in the treatment of acute periradicular abscesses. *Revista Brasileira de Odontologia*, v. 71, n. 2, p. 120–123, jul./dez. 2014.
4. AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS (AEE). Guidance on the use of systemic antibiotics in endodontics. *Journal of Endodontics*, v. 43, n. 9, p. 1409–1413, set. 2017.
5. ANDRADA, A. C. *et al.* Immunomodulation mediated by azithromycin in experimental periapical inflammation. *Journal of Endodontics*, v. 46, n. 11, p. 1648–1654, nov. 2020. DOI: 10.1016/j.joen.2020.07.028.
6. AZUMA, M. M. *et al.* Omega 3 fatty acids reduce inflammation in rat apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, v. 44, p. 604–608, 2018.
7. BAGLIE, S. *et al.* Plasma and salivary amoxicillin concentrations and effect against oral microorganisms. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, v. 45, n. 10, p. 556–562, out. 2007. DOI: 10.5414/cpp45556.
8. BOLFONI, M. R.; PAPPEN, F. G.; PEREIRA-CENCI, T.; JACINTO, R. C. Antibiotic prescription for endodontic infections: a survey of Brazilian endodontists. *International Endodontic Journal*, v. 51, n. 2, p. 148–156, fev. 2018.
9. BRAZ-SILVA, P. H. *et al.* Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: a literature review. *Acta Odontologica Scandinavica*, v. 77, p. 173–180, 2019.

10. CAVALLA, F.; LETRA, A.; SILVA, R. M.; GARLET, G. P. Determinants of periodontal/periapical lesion stability and progression. *Journal of Dental Research*, v. 100, p. 29–36, 2021. DOI: 10.1177/0022034520952341.
11. CHENG, X. *et al.* Effects of non-steroidal anti-inflammatory and antibiotic drugs on the oral immune system and oral microbial composition in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 507, n. 1-4, p. 420–425, dez. 2018.
12. CHENG, X. *et al.* Effects of antibiotic use on saliva antibody content and oral microbiota in Sprague Dawley rats. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, p. 721691, 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.721691.
13. CINTRA, L. T. *et al.* Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. *Journal of Endodontics*, v. 40, n. 8, p. 1139–1144, ago. 2014.
14. CIONE, A. P. P.; LIBERALE, M. J.; SILVA, P. M. Desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação de associação de ampicilinas em pó liofilizado para injeção. *Química Nova*, v. 33, n. 1, p. 203–207, 2010.
15. CISTERNA, C.; RIVERA, O.; DUTZAN, N. Recuento de células infiltrantes CD4+, CD8+ y CD19+ en el tejido gingival de individuos con periodontitis crónica. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, v. 1, p. 57–60, 2008. DOI: 10.1016/S0718-5391(08)70009-0.
16. COLAVITE, P. M. *et al.* TBX21-1993T/C polymorphism association with Th1 and Th17 response at periapex and with periapical lesions development risk. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 105, p. 609–619, 2019. DOI: 10.1002/JLB.6A0918-339R.
17. COLIC, M. *et al.* Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 39, n. 9, p. 690–696, out. 2010.
18. COLIĆ, M. *et al.* Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesion. *Molecular Immunology*, v. 47, n. 1, p. 101–113, 2009.

19. CRUVINEL, W. de M. *et al.* Immune system – part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, n. 4, p. 434–461, jul./ago. 2010.
20. CUTLER, C. W.; JOTWANI, R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontology 2000*, v. 35, p. 135–157, 2004.
21. CYSTER, J. G.; ALLEN, C. D. C. B cell responses: cell interaction dynamics and decisions. *Cell*, v. 177, p. 524–540, 2019. DOI: 10.1016/j.cell.2019.03.016.
22. Davey PG, Jacobus NV, Tally FP. Comparative efficacy of clyndamicin, erythromycin and spiramycin against *Staphylococcus aureus* in the rat croton oil pouch model. *J Antimicrob Chemother.* 1987;20(5):705-712.
23. DEWHIRST, F. E. *et al.* The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*, v. 192, n. 19, p. 5002–5017, 2010. DOI: 10.1128/JB.00542-10.
24. DI SANTI, B. T. *et al.* Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias facultativas isoladas de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico frente a antibióticos de uso sistêmico. *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 44, n. 4, p. 200–206, jul./ago. 2015.
25. DONG, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, p. 337–348, 2008.
26. ESKAN, M. A. *et al.* The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nature Immunology*, v. 13, p. 465–473, 2012. DOI: 10.1038/ni.2260.
27. DUARTE FARIA, F. *et al.* Influence of systemic antibiotic therapy on the development and progression of induced apical periodontitis in Wistar rats. *Odontology*, v. 112, n. 4, p. 1080–1089, out. 2024. DOI: 10.1007/s10266-024-00908-2.

28. DUNN, O. J. Estimation of the means of dependent variables. *Annals of Mathematical Statistics*, v. 29, n. 4, p. 1095–1111, 1958.
29. Faleiros, P. Influência do hidrocloreto de tetraciclina associada à terapia fotodinâmica no tratamento da doença periodontal causada: estudo histomorfométrico e imunoistoquímico em ratos. 2012.
30. Fernandes, L. Ação da terapia fotodinâmica no tratamento da doença periodontal experimentalmente induzida em ratos tratados ou não com nicotina: estudo histológico, histométrico e imunoistoquímico. 2010.
31. FUJITA, S. *et al.* Distribution of natural killer cells in periodontal diseases: an immunohistochemical study. *Journal of Periodontology*, v. 63, p. 686–689, 1992.
32. GALLER, K. M. *et al.* Inflammatory response mechanisms of the dentine-pulp complex and the periapical tissues. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, p. 1480, 2021. DOI: 10.3390/ijms22031480.
33. GAMA, T. *et al.* Cellular profile and expression of immunologic markers in chronic apical periodontitis from HIV-infected patients undergoing highly active antiretroviral therapy. *Journal of Endodontics*, v. 42, n. 6, p. 921–927, 2016. DOI: 10.1016/j.joen.2016.03.008.
34. Goodwani S, Rao PSS, Bell RL, Sari Y. Amoxicillin and amoxicillin/clavulanate reduce ethanol intake and increase GLT-1 expression as well as AKT phosphorylation in mesocorticolimbic regions. *Brain Res.* 2015 Oct 5;1622:397-408.
35. GRAVES, D. T.; OATES, T.; GARLET, G. P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of Oral Microbiology*, v. 3, p. 1–14, 2011.
36. Hersperger, A. (2010). Insights into the Cytotoxic Potential of Human CD8+ T Cells: Implications for Virologic Control of HIV.

37. JACINTO, R. C. *et al.* Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infections. *Journal of Endodontics*, v. 34, n. 12, p. 1451–1456, dez. 2008.
38. JAGER, A.; KUCHROO, V. K. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 72, p. 173–184, 2010.
39. JEFFCOAT, M. K.; REDDY, M. S. Progression of probing attachment loss in adult periodontitis. *Journal of Periodontology*, v. 62, p. 185–189, 1991.
40. JUNQUEIRA, L. C. U.; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry*, v. 74, p. 153–156, 1982. DOI: 10.1007/BF00495061.
41. KAWAI, T. *et al.* B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *The American Journal of Pathology*, v. 169, p. 987–998, 2006. DOI: 10.2353/ajpath.2006.060180.
42. LAMMINTAUSTA, K.; TOKOLA, R.; KALIMO, K. Cutaneous adverse reactions to clindamycin: results of skin tests and oral exposure. *British Journal of Dermatology*, v. 146, p. 643–658, 2002.
43. LANG, P. M. *et al.* Resistance profiles to antimicrobial agents in bacteria isolated from acute endodontic infections: systematic review and meta-analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 48, n. 5, p. 467–474, nov. 2016.
44. LI, H. *et al.* Clindamycin hydrochloride and clindamycin phosphate: two drugs or one? A retrospective analysis of a spontaneous reporting system. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v. 73, p. 251–253, 2016.
45. Longo, M. Avaliação de diferentes protocolos de aplicação da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) no tratamento da periodontite causada em ratos imunossuprimidos com droga quimioterápica: estudo histomorfométrico, imunoistoquímico, imunológico e microbiológico. 2015.

46. LORENZI, J.; BARBOSA-LORENZI, V.; ZANETTE, D. Linfócitos T CD4⁺ e a resposta imune. *Ensaio e Ciência*, v. 2, p. 5–9, 2012. DOI: 10.6008/ESS2236-9600.2012.001.0001.
47. MA, H. *et al.* Phase separation in innate immune response and inflammation-related diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1086192, 2023.
48. MITROI, M. *et al.* Differences in the distribution of CD20, CD3, CD34 and CD45RO in nasal mucosa and polyps from patients with chronic rhinosinusitis. *Molecular Medicine Reports*, v. 19, n. 4, p. 2792–2800, abr. 2019.
49. MORAES, L. C. *et al.* Microbial ecology and predicted metabolic pathways in various oral environments from patients with acute endodontic infections. *International Endodontic Journal*, v. 53, n. 12, p. 1603–1617, dez. 2020. DOI: 10.1111/iej.13389.
50. MUCIDA, D.; CHEROUTRE, H. The many face-lifts of CD4 T helper cells. *Advances in Immunology*, v. 107, p. 139–152, 2010.
51. MURPHY, K. M.; REINER, S. L. The lineage decisions of helper T cells. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, p. 933–944, 2002.
52. NAIR, P. N. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, v. 15, n. 6, p. 348–381, nov. 2004.
53. NAIRI, V. *et al.* Adsorption and release of ampicillin antibiotic from ordered mesoporous silica. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 497, p. 217–225, jul. 2017.
54. JOSHI, N. S.; KAECH, S. M. Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation. *The Journal of Immunology*, v. 180, n. 3, p. 1309–1315, fev. 2008. DOI: 10.4049/jimmunol.180.3.1309.
55. OBEROI, S. S. *et al.* Antibiotics in dental practice: how justified are we. *International Dental Journal*, v. 65, n. 1, p. 4–10, fev. 2015.

56. ORECCHIONI, M. *et al.* Macrophage polarization: different gene signatures in M1(LPS+) vs. classically and M2(LPS-) vs. alternatively activated macrophages. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 1084, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01084.
57. PRADA, I. *et al.* Update of the therapeutic planning of irrigation and intracanal medication in root canal treatment: a literature review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, v. 11, n. 2, p. e185–e193, fev. 2019.
58. Rao PS. *et al.* Effects of ampicillin, cefazolin and cefoperazone treatments on GLT-1 expressions in the mesocorticolimbic system and ethanol intake in alcohol-preferring rats. *Neuroscience*. 2015 Jun 4;295:164-74.
59. RHEINLÄNDER, A.; SCHRAVEN, B.; BOMMHARDT, U. CD45 in human physiology and clinical medicine. *Immunology Letters*, v. 196, p. 22–32, 2018.
60. RICUCCI, D.; SIQUEIRA, J. F. Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *Journal of Endodontics*, v. 36, n. 8, p. 1277–1287, ago. 2010. DOI: 10.1016/j.joen.2010.04.007.
61. ROSENBERG, M. Clindamycin. *Pediatrics in Review*, v. 17, n. 10, p. 373–374, 1996. DOI: 10.1542/pir.17-10-373.
62. SAFFARI, F. *et al.* Virulence genes, antibiotic resistance and capsule locus polymorphisms in *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Infection and Chemotherapy*, v. 50, n. 4, p. 340–345, dez. 2018.
63. SEGURA-EGEA, J. J. *et al.* Antibiotics in endodontics: a review. *International Endodontic Journal*, v. 50, n. 12, p. 1169–1184, dez. 2017.
64. SEGURA-EGEA, J. J. *et al.* European Society of Endodontology position statement: the use of antibiotics in endodontics. *International Endodontic Journal*, v. 51, n. 1, p. 20–25, jan. 2018. DOI: 10.1111/iej.12781.
65. SILVA, N. *et al.* Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of Applied Oral Science*, v. 23, n. 3, p. 329–355, 2015.

66. SILVA, N. M.; ANJOS NETO, D. A. Systemic medication applied to endodontic treatment: a literature review. *RSBO*, v. 11, n. 3, p. 293–302, jul./set. 2014.
67. SILVA, T. A. *et al.* Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *Journal of Dental Research*, v. 86, p. 306–319, 2007.
68. SIMON-SORO, A.; MIRA, A. Solving the etiology of dental caries. *Trends in Microbiology*, v. 23, n. 2, p. 76–82, 2015. DOI: 10.1016/j.tim.2014.10.010.
69. SKUCAITE, N. *et al.* Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, v. 36, n. 10, p. 1611–1616, out. 2010.
70. SOARES, G. M. S. *et al.* Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *Journal of Applied Oral Science*, v. 20, n. 3, p. 295–309, maio/jun. 2012.
71. STASHENKO, P.; TELES, R.; D'SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, v. 9, n. 4, p. 498–521, 1998. DOI: 10.1177/10454411980090040701.
72. STASHENKO, P. *et al.* Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 78, n. 4, p. 494–502, out. 1994. DOI: 10.1016/0030-4220(94)90044-2.
73. STELIN, S. *et al.* Immunohistological analysis of CD1a+ Langerhans cells and CD57+ natural killer cells in healthy and diseased human gingival tissue: a comparative study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, v. 13, n. 3, p. 150–154, set. 2009.
74. STERN, M. H. *et al.* Quantitative analysis of cellular composition of human periapical granuloma. *Journal of Endodontics*, v. 7, n. 3, p. 117–122, mar. 1981. DOI: 10.1016/S0099-2399(81)80125-2.
75. TORABINEJAD, M.; KETTERING, J. D. Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions.

- Journal of Endodontics*, v. 11, n. 3, p. 122–125, mar. 1985. DOI: 10.1016/S0099-2399(85)80230-2.
76. TSOUMIS, G. S.; SINGH, G.; DOLBY, A. E. Human antibody-dependent cellular cytotoxicity and natural killer cytotoxicity in periodontal disease: a preliminary report. *Journal of Periodontal Research*, v. 20, n. 2, p. 122–130, mar. 1985. DOI: 10.1111/j.1600-0765.1985.tb00419.x.
77. WEN, Y. H. *et al.* The immune landscape in apical periodontitis: from mechanism to therapy. *International Endodontic Journal*, v. 57, n. 11, p. 1526–1545, nov. 2024. DOI: 10.1111/iej.14125.
78. XIONG, H.; WEI, L.; PENG, B. Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions. *Journal of Endodontics*, v. 35, n. 2, p. 216–220, fev. 2009.
79. YOKOYAMA, W. M.; KIM, S.; FRENCH, A. R. The dynamic life of natural killer cells. *Annual Review of Immunology*, v. 22, p. 405–429, 2004.
80. ZAFFIRINI, L.; GARDNER, J.; TOLEDO-PEREYRA, L. H. History of antibiotics: from Salvarsan to cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery*, v. 25, n. 2, p. 67–77, abr. 2012.
81. ZANCAN, R. F. *et al.* Antimicrobial activity and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes used as intracanal medication. *Journal of Endodontics*, v. 42, n. 12, p. 1822–1828, dez. 2016.
82. ZAURA, E. *et al.* Same exposure but two radically different responses to antibiotics: resilience of the salivary microbiome versus long-term microbial shifts in feces. *mBio*, v. 6, n. 6, p. e01693–15, nov. 2015. DOI: 10.1128/mBio.01693-15.