



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

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Departamento de Odontologia Restauradora – Disciplina de Endodontia

JULIANA NOBRE NAVARRO FERNANDES

**Influência da Aterosclerose no desenvolvimento da periodontite
apical. Estudo histológico em ratos.**

ARAÇATUBA-SP

2017

JULIANA NOBRE NAVARRO FERNANDES

Influência da Aterosclerose no desenvolvimento da periodontite apical. Estudo histológico em ratos.

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

Orientador: Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra

ARAÇATUBA-SP

2017

Dedicatória

Ofereço esta conquista a **Deus**,

que esteve presente em todos os momentos da minha vida. Aquele que acalmou meu coração e o preencheu de amor quando senti falta da minha família, também me dando força e discernimento quando me senti fraca. Sabedoria para aproveitar os bons momentos. Aproveito a oportunidade para agradecer pela família mais amada e dedicada, pelos amigos mais sinceros e pelos professores mais humanos que poderia ter, foram cada uma das pessoas colocadas ao meu lado que me proporcionaram vivenciar momentos inesquecíveis de crescimento intelectual e pessoal.

Obrigada por cada momento que o Senhor esteve comigo, me protegendo e guiando os meus passos, tornando cada um dos meus sonhos realidade, incluindo a concretização de mais esta fase em minha vida.

Muito obrigada!

À minha Família

*À minha mãe **Genílta** e ao meu pai **Júlio**,*

Que estiveram ao meu lado em todos os momentos da minha vida, apoiando as minhas escolhas, me corrigindo quando era oportuno e sendo suporte quando mais precisei. Vocês são os responsáveis por quem eu sou hoje, pelo coração humano que me permitiram ter. Dedico essa conquista a vocês, que tantas vezes abdicaram de suas vontades próprias para que eu pudesse realizar esse sonho.

Muito obrigada, eu amo vocês!

*À minha irmã **Gessica**,*

Que não mede esforços para me ver feliz. Você é um dos meus maiores exemplos. Desejo que o mundo seja tão acolhedor com você, assim como você é comigo. Essa conquista se tornou mais fácil com você ao meu lado. Saiba que você sempre vai poder contar comigo!

*Aos meus **avôs** e a minha **avó** materna, bem como aos meus **tios** e **tias**,*

Agradeço pelo carinho e todo apoio que me deram em toda a minha existência. Mesmo com a pouca frequência que nos vemos, sinto o amor de vocês nos pequenos gestos. Perto de vocês sou mais feliz.

*Em memória a minha avó **paterna**,*

Uma mulher que me orgulho em dizer que sou neta. Considero uma guerreira por tudo que fez pelos filhos. Toda a minha admiração e amor por você. Te levarei para sempre em meu coração!

Agradecimentos Especiais

Agradeço em primeiro lugar ao meu orientador, **Professor Luciano Tavares Angelo Cintra**, o meu exemplo de profissional dedicado, íntegro, disposto e competente. Mas acima de tudo uma pessoa maravilhosa, digna dos melhores adjetivos que possam descrevê-la. Agradeço pela oportunidade que me deu, pelos ensinamentos e por tantos momentos descontraídos. Muito obrigada por acreditar em mim e por me ajudar, com toda sua perfeição, paciência e dedicação, a realizar mais este sonho em minha vida.

Ao querido tutor **Prof. Eloí Dezan Júnior**, que esteve presente na maior parte da minha caminhada, sempre paciente e disposto a contribuir positivamente com minha formação. Começamos com um vínculo de tutor do grupo PET, passou a ser meu professor orientador da disciplina de endodontia e hoje, te considero acima de tudo como um grande amigo. Independente das suas inquestionáveis qualidades profissionais, suas qualidades como ser humano o destacam. Agradeço não só pelos ensinamentos técnicos científicos, mas também pelos incentivos, conselhos e pelas correções quando era oportuno.

À querida amiga e **Professora Mariane Maffei Azuma**, muito obrigada por tudo que você me ensinou durante essa fase da minha vida, por cada vez que me acompanhou em momentos de insegurança e acima de tudo por acreditar em meu potencial quando nem eu mesma acreditava. Você é uma pessoa ímpar na qual eu consigo destacar apenas qualidades, tenho certeza que vai ter um futuro brilhante.

À querida amiga **Leticia Cíbelli Conti**, que é parte indispensável da minha trajetória durante a iniciação científica, é difícil encontrar palavras para te agradecer da forma que merece. Sou extremamente grata por tudo que fez por mim, pelos ensinamentos, pela paciência e por não medir esforços para me ajudar, mesmo quando a nossa dúvida era a mesma. Obrigada por ser tão dedicada, por todas as vezes que me colocou para fazer as coisas ao invés de simplesmente me entregar pronto e me manter num estágio de ignorância, por cada conversa e por cada conselho. Conviver com você, com certeza, me fez amadurecer muito. Desejo a você um futuro repleto de realizações.

À querida professora **Adriana Zavanelli**, por todos os ensinamentos ao longo de quase dois anos. Sou muito grata por todas as oportunidades que me ofereceu, pude crescer muito a partir delas, não só profissionalmente, mas também como ser humano. Muito obrigada pela convivência e por encher os meus dias de alegria, pois a senhora é luz por onde passa, tem um coração imenso e isso a

destaca como pessoa. Desejo que a sua vida seja sempre repleta de momentos bons.

*Aos amigos da **Turma 59** do curso de graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, que fizeram com que esses cinco anos fossem os mais felizes anos que me lembro de ter passado. Cada um de vocês tem um espaço em meu coração!*

*A vocês minhas amigas **Amanda, Maria, Danielle e Anna Clara**, independente do que eu escreva, nunca conseguirei descrever a vocês o tamanho do amor que sinto por cada uma. Muito obrigada por me darem colo quando precisei. Por todos os ensinamentos e pelos momentos descontraídos que passamos nesses cinco anos. Também a minha amiga **Jéssica**, que além de ter passado tudo isso junto, é minha companheira de apartamento, te agradeço pelo coração imenso que tem, por se preocupar e cuidar tanto de mim! A vocês cinco, toda a minha gratidão! Aprendi com vocês que irmãos nem sempre são de sangue, que esse laço é mantido facilmente por amor, cuidado e dedicação. Agradeço a Deus, por me dar amigas irmãs, como vocês! E desejo que vocês tenham um futuro brilhante a partir de agora. Muito obrigada por tudo, eu amo vocês e sentirei saudades!*

*A vocês **Pedro, Leonardo, Murilo Cestari, Murilo Oliveira, William, Heitor e Vitor**, agradeço pelo cuidado que tiveram comigo ao longo desses cinco anos, como se fossem irmãos mais velhos, sempre me protegendo. Vocês tornaram a minha caminhada mais leve e descontraída. Saiba que sou muito feliz por ter vocês como amigos!*

*Ao meu **grupo de estudo**, sem vocês as épocas de provas teriam sido muito mais difíceis. Obrigada por me acompanharem, pelas horas dispensadas em me ensinar e explicar quando necessário. Todos os momentos pré-provas se tornaram mais descontraídos com vocês. Sobre vocês, tenho a indubitável certeza de um futuro repleto de realizações que merecem.*

*Às amigas **Ana Carla e Ariane**, agradeço pela oportunidade de termos convivido alguns anos. Aprendi muito com vocês e formamos uma verdadeira família. Não ir para casa nos feriados não era tão difícil porque eu tinha vocês e a Jéssica. Por onde eu for e estiver a minha casa sempre estará de portas abertas para receber vocês. Começamos dividindo a casa e hoje dividimos um lugar no coração, eu amo vocês.*

Às amigas **Hískell** e **Jéssica Quereza** e **Marcela** obrigada por terem sido tão receptivas em meu primeiro ano, sou muito grata por tudo que fizeram por mim! Vocês tem um lugar em meu coração.

Às minhas mestres e colegas de iniciação científica, **Caroline Barros**, **Francine Benetti**, **Marina Ottoni** e **Tais Gonçalves**, por me ajudarem prontamente sempre que precisei. Muito obrigada mesmo, de coração! Foi um prazer conviver com vocês!

À querida **Nelci**, por me ajudar e ensinar etapas importantes para a conclusão deste trabalho, eu sou muito grata a você.

Aos amigos do grupo **PET**, muito obrigada por me proporcionarem momentos tão bons. Foi um prazer conhecer um pouquinho de cada um de vocês, saibam que me lembrarei do grupo com muito carinho por ter tido vocês comigo.

Agradeço ao **“tio Marcio”** e à **“tia Marta”**, por abrirem as portas de sua casa para mim, me recebendo como uma verdadeira filha, por se preocuparem e por fazerem com que eu me sentisse mais próxima de casa, por meio do amor de vocês. A admiração e respeito que tenho por vocês é resultado do exemplo que vocês são, de pais e de humildade. Me lembrarei com muito carinho de todos os momentos que passamos juntos, vocês têm um lugar especial em meu coração, espero um dia retribuir por tudo que fizeram por mim.

Agradecimientos

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

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela concessão da bolsa de iniciação científica.

Ao Programa de Educação Tutorial- PET Odonto FOA, pela participação como bolsista e voluntária.

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

Fernandes, JNN **Influência da Aterosclerose no desenvolvimento da periodontite apical. Estudo histológico em ratos.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

Resumo

Estudos prévios demonstraram que a infecção endodôntica exerce efeitos sobre a saúde sistêmica, bem como certas alterações sistêmicas são capazes de modular o desenvolvimento da infecção endodôntica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da aterosclerose no desenvolvimento da infecção endodôntica em modelo animal. Foram utilizados 40 ratos Wistar divididos em 4 grupos com 10 animais cada: ratos controle (C); ratos com infecção endodôntica (IE); ratos com aterosclerose (AT); ratos com AT e IE (AT+IE). A AT foi induzida por meio de uma amarra realizada em torno da artéria carótida associada a uma superdose de vitamina D₃ (45.000 UI/ gota ou 1.125.000 UI/ml) e dieta hiperlipídica. Após 30 dias da indução da AT, a IE foi induzida por meio da exposição da polpa dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores ao meio oral. Decorridos mais 30 dias, os ratos foram mortos, as mandíbulas foram removidas e processadas laboratorialmente para avaliação em microscopia de luz e análises histológica e histométrica da periodontite apical. Os resultados foram analisados por testes estatísticos ($p < 0,05$). Pode-se observar semelhança na intensidade do infiltrado inflamatório entre os grupos IE e AT+IE ($p > 0,05$), no entanto observou-se maior perda óssea na região periapical no grupo IE+AT, quando comparado ao grupo IE. Conclui-se que a aterosclerose quando associada a presença de múltiplos focos de infecção endodôntica é capaz de exacerbar significativamente a perda de estrutura óssea periapical em ratos Wistar.

Palavras-Chave: Aterosclerose. Periodontite apical. Infecção endodôntica. Medicina endodôntica.

Fernandes, JNN **Influence in the development of atherosclerosis apical periodontitis. Histological study in rats.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

Abstract

Previous studies have demonstrated that endodontic infection exerts effects on systemic health, as well as certain alterations systems, are able to modulate the development of endodontic infection. The objective of this work was to evaluate the effect of atherosclerosis on the development of endodontic infection in an animal model. Wistar rats were divided into 4 groups with 10 animals each: control rats (C); rats with endodontic infection (IE); rats with atherosclerosis (AT); rats with AT and IE (AT+IE). AT was induced by means of a tie made around the carotid artery associated with an overdose of vitamin D3 (45,000 IU / drop or 1,125,000 IU / ml) and a hyperlipidic diet. After 30 days of AT induction, an IE was induced by exposing the pulp of the upper and lower first and second molars to the oral environment. After another 30 days, the rats were killed, the mandibles were removed and laboratory processed for light microscopy and histological and histometric analyzes of apical periodontitis. The results were evaluated by statistical tests ($p < 0.05$). Simulation of the intensity of the inflammatory infiltrate between the IE and AT + IE groups ($p > 0.05$) could be observed, however, a higher bone loss was observed in the periapical region in the IE+AT group, when compared to the IE group. It may be concluded that atherosclerosis when associated with the presence of multiple foci of endodontic infection and capable of significantly exacerbating the loss of periapical bone structure in Wistar rats.

Key words: Atherosclerosis. Apical periodontitis. Endodontic infection. Endodontic medicine.

SUMÁRIO

1-	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2-	PROPOSIÇÃO	16
3-	MATERIAL E MÉTODOS	17
4-	RESULTADOS	21
5-	DISCUSSÃO	26
6-	CONCLUSÃO	27
7-	REFERÊNCIAS	28
8-	ANEXOS	32

1. Introdução

A infecção endodôntica tem como consequência o desenvolvimento da periodontite apical (Colic et al., 2010), que são desenvolvidas devido à resposta do hospedeiro ao estímulo antigênico contínuo advindo dos canais radiculares infectados (Zhang et al., 2005; Xiong et al., 2009). Do ponto de vista histológico pode ser caracterizada por um tecido granulomatoso infiltrado por diferentes tipos de células inflamatórias (Lukic et al., 2008), que é devido à ativação da resposta imunológica, mediada pela produção de citocinas (Xiong et al., 2009; Colic et al., 2010). As citocinas são produzidas como resposta às bactérias e seus produtos e mantêm a resposta inflamatória (Xiong et al., 2009; Colic et al., 2010; Fan et al., 2011), favorecendo à degradação da matriz extracelular e, em seguida, à reabsorção óssea (Nair, 2004; Graves et al., 2011).

Foi comprovado por meio de estudos epidemiológicos realizados em todo o mundo, que a periodontite apical está presente em 22-65% dos dentes tratados endodonticamente (Siqueira et al., 2005; Dugas et al., 2003). Além disso, a população brasileira obteve como média 2,7 periodontites apicais presentes por indivíduo (Marota et al., 2012), evidenciando ser comum a presença de mais de um foco infeccioso por pessoa. Esses dados são de grande importância para evidenciar a correlação da periodontite apical com possíveis alterações do organismo.

A influência da infecção endodôntica na saúde sistêmica tem sido alvo de intensos estudos de nosso grupo de pesquisa (Astolphi et al., 2015; Azuma et al., 2017; Cintra et al., 2017; Samuel et al., 2017; Pereira et al., 2016; Pereira et al., 2017; Prieto et al., 2017.), em ratos normoglicêmicos e em ratos diabéticos, onde foi visto que a infecção endodôntica quando associada com a diabetes e com a doença periodontal pode aumentar os níveis de triglicérides (Cintra et al. 2013a), creatinina (Cintra et al. 2013b), mediadores pró-inflamatórios como a IL-17 (Cintra et al., 2014b), hemoglobina glicada (Cintra et al. 2014c), além de alterar alguns parâmetros do hemograma, destacando-se a série branca (Cintra et al., 2014a), bem como, é capaz de alterar o sinal insulínico do sangue e do tecido muscular (Astolphi et al., 2013; Astolphi et al., 2014).

Nossos estudos evidenciaram que a presença de quatro periodontites apicais foi capaz de aumentar os níveis de triglicérides (artigo enviado para publicação), células inflamatórias (artigo enviado para publicação), e mediadores pró-inflamatórios, como IL-17, IL-6, TNF- α , IL-23 e óxido nítrico (Cintra et al., 2016b) no sangue de ratos, o que sustentam a hipótese de que a presença da periodontite apical pode comprometer o equilíbrio fisiológico de um indivíduo. Sendo assim, temos o objetivo de estudar a possível relação entre a infecção endodôntica, caracterizada pela periodontite apical, e as doenças ou alterações sistêmicas.

Nesse contexto, a aterosclerose tem sido alvo de intensos estudos na área de periodontia (Bartova et al., 2014; Kudo et al., 2015; Tapashetti et al., 2014), pois as causas de morte mais comuns são as doenças cardiovasculares ateroscleróticas, representando cerca de 30% de mortalidade e morbidade de todo o mundo (Ridker et al., 2008). Foi observado que a presença de doença periodontal teve a capacidade de aumentar os níveis da proteína C reativa, um marcador que pode ser utilizado para prever a ocorrência de doenças cardiovasculares (Tapashetti et al., 2014; Etemadifar et al., 2015). Outros estudos realizados com humanos comprovaram que a presença da doença periodontal se relaciona com o risco dos pacientes desenvolverem a aterosclerose (Kudo et al., 2015; Bartova et al., 2014; Lopez, 2014).

Sabemos que o mecanismo imunológico da doença periodontal se assemelha com o da periodontite apical (Rupft et al. 2000), que os processos biológicos que fazem a correlação entre a doença periodontal crônica e desordens sistêmicas são os mesmos que podem ligar a periodontite apical crônica e a saúde geral do indivíduo (Silva et al., 2007).

Os fatores predisponentes para o desenvolvimento da aterosclerose ainda estão sendo estudados e uma das hipóteses, trata-se da formação das placas ateroscleróticas por meio de alterações sofridas pelo endotélio, decorrentes de lesões mecânicas com posterior contaminação por toxinas, íons metálicos e radicais livres (Ross, 1999; Higashi et al., 2009). Outra hipótese é o transporte de lipoproteínas de baixa densidade por meio do endotélio, onde são oxidadas e agem como fatores quimiotáticos para monócitos/macrófagos, conduzindo a formação de células espumosas (Steinberg, 1993; Rufail et al., 2007). A aterosclerose é uma doença multifatorial, e tem como fatores de risco lipoproteínas circulantes (hipercolesterolemia), predisposição genética, hipertensão, tabagismo, obesidade e diabetes (Christiakov et al., 2015; Park et al., 2015; Unruh et al., 2015; Bouchi et al., 2015).

Desta forma, a proposta do presente estudo foi avaliar a influência da aterosclerose no desenvolvimento e progressão da Infecção Endodôntica, por meio da análise do perfil inflamatório e da perda de estrutura óssea periapical em ratos Wistar.

2. Proposição

- Analisar o perfil inflamatório periapical em ratos portadores de aterosclerose por meio da atribuição de escores previamente definidos para a intensidade dos eventos inflamatórios;
- Analisar a perda de estrutura óssea periapical por meio da análise histométrica das lesões periapicais em ratos portadores de aterosclerose;

- Comparar os aspectos microscópicos observados em função da periodontite apical e da aterosclerose nos diferentes grupos.

3. Material e Métodos

Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 250g, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP. Os animais foram mantidos em mini-isoladores individuais, alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água *ad libitum*, exceto 12 horas antes das intervenções e 6 horas após as intervenções. As gaiolas foram mantidas em ambiente com temperatura oscilando entre 22 e 24°C e com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro). Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram aprovados previamente pelo comitê de conduta ética em experimentação animal (CEEA / FOA- 00358- 2016).

Os animais permaneceram em quarentena para adaptação no novo habitat e para contenção de alguma possível doença de fácil propagação. Na semana anterior ao procedimento cirúrgico, os animais foram vermifugados com Ivermectina 1% via oral (0,3 ml dissolvidos em 1L de água). O protocolo anestésico utilizado para o procedimento cirúrgico de indução da aterosclerose e indução da periodontite apical foi à base de Xilazina 2% (relaxante muscular, analgésico e sedativo, Xilazin, Syntec do Brasil LTDA- Cotia, São Paulo, Brasil- 10mg/ml) e de Cloridrato de Cetamina a 10% (Ketamina Agener 10%, União Química Farmacêutica Nacional S/A- Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil- 80mg/Kg), via intramuscular.

3.1 Indução da aterosclerose

Os ratos foram previamente anestesiados conforme protocolo descrito. Foi realizada a tricotomia da área a ser operada e, em seguida, a desinfecção com álcool iodado. Os animais ficaram em posição supina em mesa cirúrgica para ratos, foi então, realizada uma incisão na linha média do pescoço para isolamento da artéria carótida direita, com o intuito de evitar danos aos vasos e nervos presentes nesta região. Com o auxílio de uma agulha estéril com 0,3mm de diâmetro e de um fio de sutura (5-0), foi realizada uma amarria sob a artéria, a uma distância de 1,5 cm da sua bifurcação. Depois de realizada a amarria, removemos a agulha, e a sutura permaneceu em torno da artéria carótida. Assim, o diâmetro interno da estenose permaneceu aproximadamente 0,3mm de diâmetro. Os ratos dos grupos sem aterosclerose foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, entretanto, sem a realização da amarria.

Após a cirurgia de indução da aterosclerose foi administrado uma dose única de Sulfato de Gentamicina 40mg, (Gentamisan®; Santisa Laboratório Farmacêutico S/A, São Paulo, Brasil - 3,5ml/Kg), via intramuscular (Wang, 2015) e uma dose única de Dipirona Sódica 500 mg (D-500, Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda, Brasil – 0,1 ml/Kg), como analgésico, via subcutânea.

Um dia após o procedimento cirúrgico para indução da aterosclerose, foi administrada uma dose, via oral, de vitamina D₃ equivalente a 90.000 UI (Manipulada por Apothicário e equivalente a 45.000 UI/por gota ou 1.125.000 UI/ml), durante 2 dias, nos grupos em que tiveram a amarrilha realizada (Wang, 2015).

Os ratos dos grupos C e IE foram alimentados com ração convencional (Labina® (Purina Agribands do Brasil Ltda, Paulínia, São Paulo, Brasil). Já os ratos dos grupos com aterosclerose (AT e AT+IE) de uma associação de 75% da ração convencional associada a 20% de banha de porco e 5% de açúcar, durante todo o período experimental.

3.2 Indução da periodontite apical

Após 30 dias da indução da aterosclerose, os ratos foram novamente anestesiados pelo mesmo protocolo descrito anteriormente para indução da periodontite apical. As polpas dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores de cada animal foram expostas, por meio de uma broca em aço carbono (Broca Ln Long Neck- Maillefer, Dentsply) dotada de uma esfera na extremidade com 0,1 mm de diâmetro. Assim, todas as exposições pulpares ficaram padronizadas com 0,1 mm de diâmetro (Cintra et al., 2014a) e as polpas ficaram expostas na cavidade bucal por um período de 30 dias até o momento da eutanásia.

3.3 Divisão em grupos

Os 40 ratos em estudo foram divididos em quatro grupos experimentais, contendo 10 animais em cada grupo, de acordo com a condição sistêmica e procedimentos locais de indução das periodontites apicais:

- Ratos controle (C): ratos sem indução de aterosclerose e sem exposição pulpar;
- Ratos com exposição pulpar (IE): ratos portadores de periodontite apical;
- Ratos com aterosclerose (AT): ratos portadores de aterosclerose e sem exposição pulpar;
- Ratos com aterosclerose + exposição pulpar (AT+IE): ratos portadores de aterosclerose e periodontite apical;

3.4 Coleta de material para análise

Decorrido o período total de 60 dias, os animais foram mortos com uma sobredose de Tiopental sódico via intraperitoneal (150mg/Kg Thiopentax®; Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda., São Paulo, Brasil).

Após morte, toda a pele correspondente à face direita do animal foi removida e foram realizados dois cortes, com tesoura, situados no ângulo da boca, separando a mandíbula da maxila. A mandíbula foi seccionada ao meio, obtendo-se a hemimandíbula direita contendo os dentes com periodontite apical, objeto do estudo.

3.5 Processamento histológico

As hemimandíbulas foram colocadas imediatamente em frascos individuais devidamente identificados, contendo formol 10%, tamponada com pH neutro, durante as primeiras 24 horas e depois lavadas em água corrente por um período de 12 horas para a remoção de toda solução de fixação. Após a fixação, as peças foram desmineralizadas em solução de EDTA a 18%. Posteriormente, as hemimandíbulas foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A orientação no momento da inclusão permitiu a realização de cortes teciduais do alvéolo em seu sentido longitudinal englobando o tecido periapical a ser analisado. Após inclusão as peças foram cortadas com cortes semi-seriados, com 5 µm de espessura, realizados em micrótomo.

3.6 Forma de análise dos resultados

Para a análise histológica e histométrica das lesões periapicais foram empregadas 5 lâminas com 3 cortes teciduais cada, preparadas e coradas com hematoxilina e eosina (Lillie, 1954). A análise histológica foi necessária para caracterização do perfil inflamatório das lesões periapicais e a análise histométrica para verificação do desenvolvimento das lesões em função dos grupos (Cintra et al. 2014a).

Os resultados foram expostos por meio de duas análises, sendo uma descritiva e outra quantitativa. As lâminas contendo os cortes representativos de cada espécime foram avaliadas sob a microscopia óptica e utilizadas na análise descritiva. A análise descritiva consistiu na descrição dos fenômenos histopatológicos, procurando caracterizá-los globalmente em função das variáveis experimentais (Cintra et al. 2014a).

A análise quantitativa foi realizada por meio da atribuição de escores, graduando as magnitudes dos fenômenos histopatológicos de forma dissociada e da análise histométrica das estruturas do periodonto apical (Cintra et al. 2014a). As variáveis estudadas foram: infiltrado

inflamatório e perda de estrutura óssea periapical. Para o critério infiltrado inflamatório foi atribuído escores e para a perda de estrutura óssea foi realizada a mensuração histométrica, empregando programa de imagens específico (Leica QWin Plus - Leica Microsystems, Nussloch – Germany).

Os critérios considerados para cada análise foram:

- **Intensidade do infiltrado inflamatório**

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

Quadro A – Escores para o critério intensidade do infiltrado inflamatório

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

- **Perda de estrutura óssea**

Foram selecionados cortes representativos de cada espécime dos grupos com periodontite apical portadores ou não de aterosclerose para a verificação da influência da aterosclerose no desenvolvimento da periodontite apical. Foi empregado o software Leica QWin Plus (Leica Microsystems, Nussloch – Germany) e os valores foram expressos em micrômetro quadrado (μm^2), obtidos em medidas de área.

3.7 Análise estatística

Com relação à intensidade do infiltrado inflamatório realizou-se o teste estatístico de Kruskal Wallis entre os grupos C, IE, AT e AT+IE e observou-se que ambos os grupos com infecção endodôntica apresentaram diferenças em relação ao grupo C e ao grupo AT ($p < 0,05$). Entretanto, apesar de apresentarem medianas 3 (IE) e 3,5 (AT+IE) os grupos experimentais não foram diferentes entre si quanto a este critério, considerando o nível de significância de 5% e o tamanho da amostra utilizada.

Com relação à perda de estrutura óssea, realizou-se o teste estatístico “t” de Student entre os grupos que foram induzidos à infecção endodôntica (IE e AT+IE), sendo excluídos os grupos C e AT da análise estatística por não apresentarem valores neste critério. O grupo IE obteve média de perda óssea no valor de $151.41 \times 10^4 \mu\text{m}^2$, enquanto o grupo IE+AT apresentou média de $206.41 \times 10^4 \mu\text{m}^2$. Quando submetidos à análise estatística, foi observado diferença significativa entre os 2 grupos experimentais ($p=0,031742$). Diante deste resultado pode-se confirmar que a aterosclerose foi capaz de exacerbar a perda de estrutura óssea periapical em ratos com infecção endodôntica, pois as lesões periapicais do grupo IE+AT foram significativamente maiores quando comparadas às lesões do grupo IE.

Tabela 5 – Escores, medianas e medidas atribuídas aos diferentes grupos considerando os parâmetros de análise histológica

Intensidade do infiltrado inflamatório	Grupos				Análise estatística
	C	IE	AT	AT+IE	
1 – Ausente	10/10	0/10	10/10	0/10	
2 – Leve	0/10	2/10	0/10	2/10	<i>Kruskal-wallis</i>
3 – Moderado	0/10	4/10	0/10	3/10	<i>P < 0,05</i>
4 – Severo	0/10	4/10	0/10	5/10	
Mediana*	1 ^a	3 ^b	1 ^a	3,5 ^b	
Tamanho da lesão ($\times 10^4 \mu\text{m}^2 \pm$ desvio padrão*)	-	151.41 \pm 49.11 ^a	-	206.41 \pm 56.28 ^b	<i>Teste T</i> <i>Student</i> <i>P < 0,05</i>

4. Resultados

4.1 Análise histológica

Grupo Controle (C) - Ratos sem indução de aterosclerose e sem exposição pulpar

Observou-se normalidade no tecido conjuntivo da polpa dentária, caracterizando homeostasia pulpar. O tecido dentinário apresentou-se íntegro, com a dentina e a pré- dentina dispostas em continuidade com a camada de odontoblastos, também em homeostase. Poucas células inflamatórias estavam dispersas, caracterizando ausência de inflamação. Os vasos sanguíneos apresentavam-se congestionados e a densidade do fibrosamento caracterizou polpa jovem com potencial de reparo. O cimento, ligamento e osso alveolar apresentaram-se livres de processo inflamatório ou reabsorção, caracterizando normalidade. Este grupo serviu como

parâmetro para a análise dos demais, para avaliação do comprometimento das estruturas dentárias, de suporte ou sustentação.

Tabela 1 – Escores e valores atribuídos ao grupo C em função dos critérios de análise

		Intensidade do infiltrado inflamatório				Perda de Estrutura Óssea
		1	2	3	4	Mm
E s p é c i m e s	1	X				0
	2	X				0
	3	X				0
	4	X				0
	5	X				0
	6	X				0
	7	X				0
	8	X				0
	9	X				0
	10	X				0

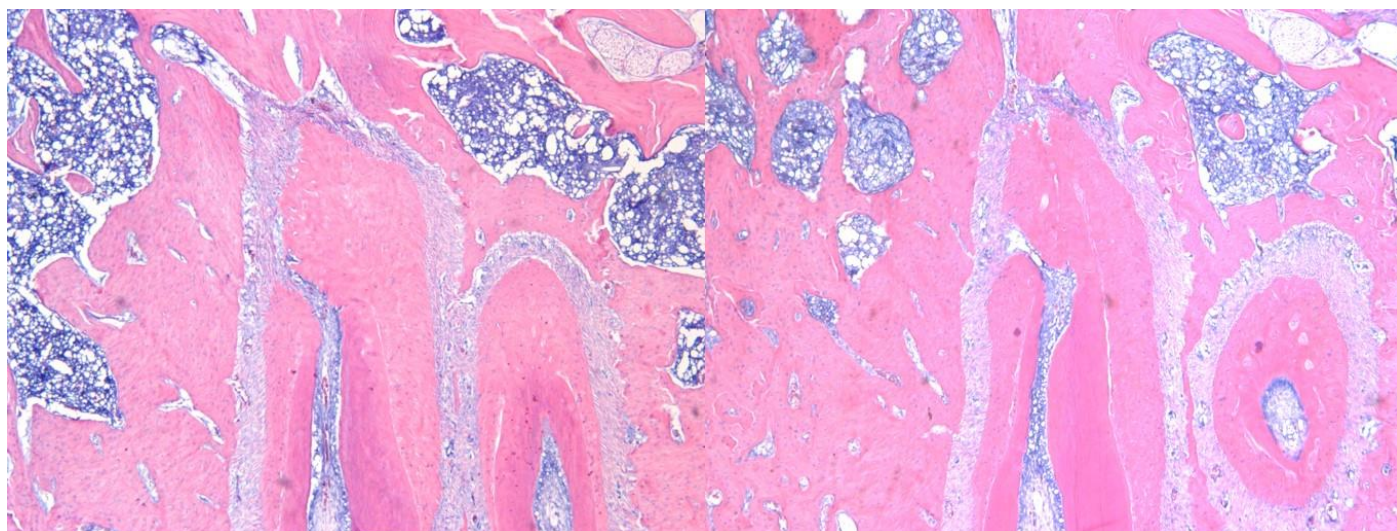


Figura 1 - Imagem representativa de espécime do grupo C: Aspecto panorâmico do terço apical do elemento dentário evidenciando normalidade nos tecidos pulpares e periapicais [100x - H.E.].

Grupo IE- Ratos portadores de periodontite apical

Pôde-se observar em todos os espécimes analisados presença de tecido necrosado em toda a câmara pulpar e canal radicular. Observou-se a predominância de infiltrado inflamatório de intensidade moderado a intenso. Em dois casos tivemos infiltrado inflamatório discreto. A região do ligamento periodontal, junto ao vértice apical, apresentou-se desorganizada, com presença de tecido necrosado e inflamação subjacente em todos os casos. Todas as lesões encontradas foram de características compatíveis com granuloma periapical com origem devido à necrose pulpar.

Tabela 2 – Escores e valores atribuídos ao grupo IE em função dos critérios de análise

		Intensidade do infiltrado inflamatório				Perda de Estrutura Óssea
		1	2	3	4	μm^2
E s p é c i m e s	1		X			805,000
	2			X		1.578,000
	3			X		1.774,000
	4				X	1.802,000
	5				X	888,000
	6				X	2.468,000
	7			X		1.690,000
	8		X			1.109,000
	9				X	1.604,000
	10			X		1.423,000

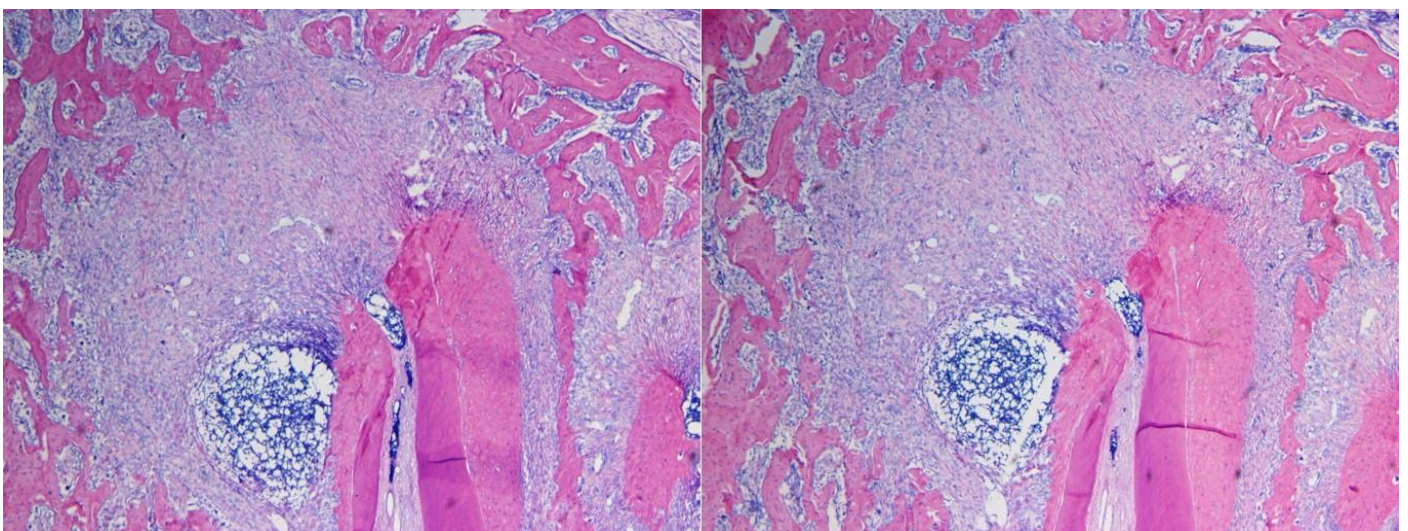


Figura 2 - Imagens representativas de espécime do grupo IE: Aspecto microscópico panorâmico do periápice dentário evidenciando presença de inflamação, desorganização do ligamento periodontal, extensa área de reabsorção óssea, evidenciando presença de infiltrado inflamatório moderado de predominância crônica e área localizada de concentração celular de polimorfo-nucleares [100x - H.E.].

Grupo AT- Ratos portadores de aterosclerose e sem exposição pulpar

Assim como no grupo C, observou-se tecido pulpar com aspectos de normalidade denotando homeostasia pulpar. O tecido dentinário apresentou-se íntegro, com a dentina e pré-dentina dispostas em continuidade com a camada de odontoblastos, também em homeostase. Poucas células inflamatórias estavam dispersas e, ao acaso, caracterizando ausência de inflamação. Os vasos sanguíneos apresentavam-se congestionados e a densidade do fibrosamento caracterizou polpa jovem com potencial de reparo. O cemento, ligamento e osso alveolar apresentaram-se íntegros e isentos de processo inflamatório ou reabsorção, caracterizando normalidade.

Tabela 3 – Escores e valores atribuídos ao grupo AT em função dos critérios de análise

		Intensidade do infiltrado inflamatório				Perda de Estrutura Óssea
		1	2	3	4	Mm
E s p é c i m e s	1	X				0
	2	X				0
	3	X				0
	4	X				0
	5	X				0
	6	X				0
	7	X				0
	8	X				0
	9	X				0
	10	X				0

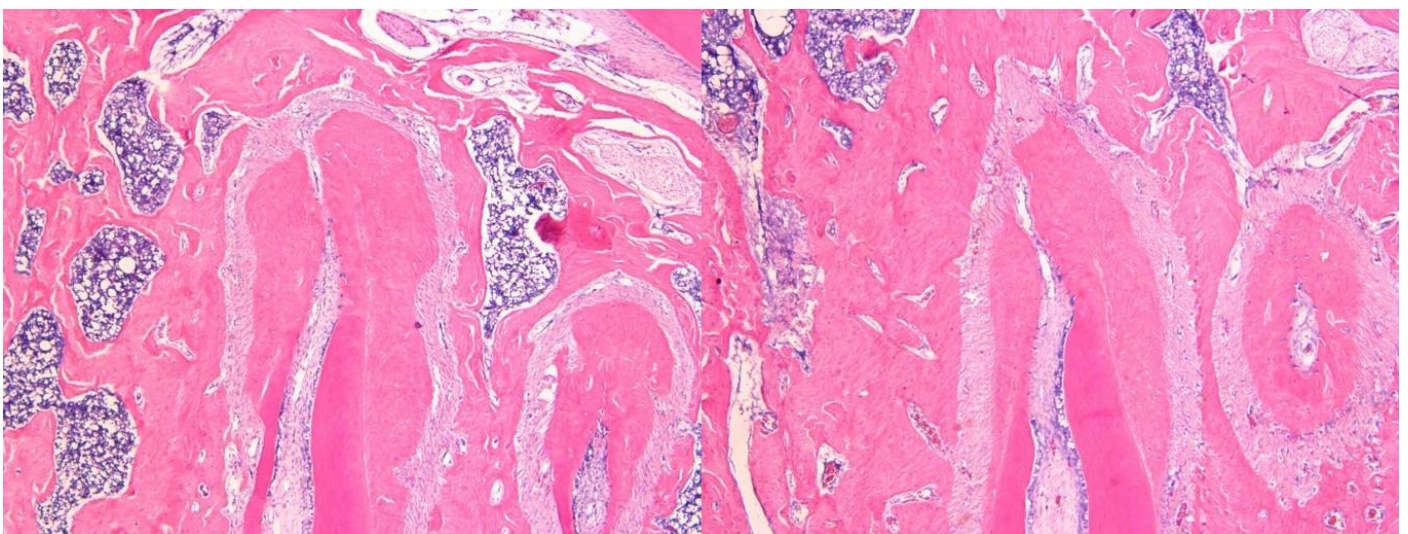


Figura 3 - Imagem representativa de espécime do grupo AT: Aspecto panorâmico do elemento dentário murino evidenciando normalidade nos tecidos pulpare e periapicais [100x - H.E.].

Grupo AT+ IE- Ratos portadores de aterosclerose e periodontite apical

De forma semelhante ao grupo IE, observou-se em todos os espécimes, tecido necrosado em toda a cavidade pulpar, e canal radicular, estendendo-se ao periápice dentário. Junto a periápice evidenciou-se a predominância de infiltrado inflamatório de intensidade discreta em 2 espécimes, moderada em 3 espécimes e intenso em 5 espécimes. Junto ao tecido ósseo foram encontradas lacunas de reabsorção ativa em toda a periferia do granuloma. A região do ligamento periodontal e região óssea subjacente apresentaram-se desorganizada, com presença de tecido necrosado e inflamação em todos os casos. Assim como observado no grupo IE, todas as lesões encontradas foram de características compatíveis com granuloma periapical.

Tabela 4 – Escores e valores atribuídos ao grupo AT+IE em função dos critérios de análise

		Intensidade do infiltrado inflamatório				Perda de Estrutura Óssea
		1	2	3	4	μm^2
E s p é c i m e s	1			X		1.674,000
	2				X	1.867,000
	3			X		1.830,000
	4		X			1.305,000
	5		X			1.610,000
	6				X	2.403,000
	7				X	3.110,000
	8				X	2.842,000
	9				X	2.015,000
	10			X		1.985,000

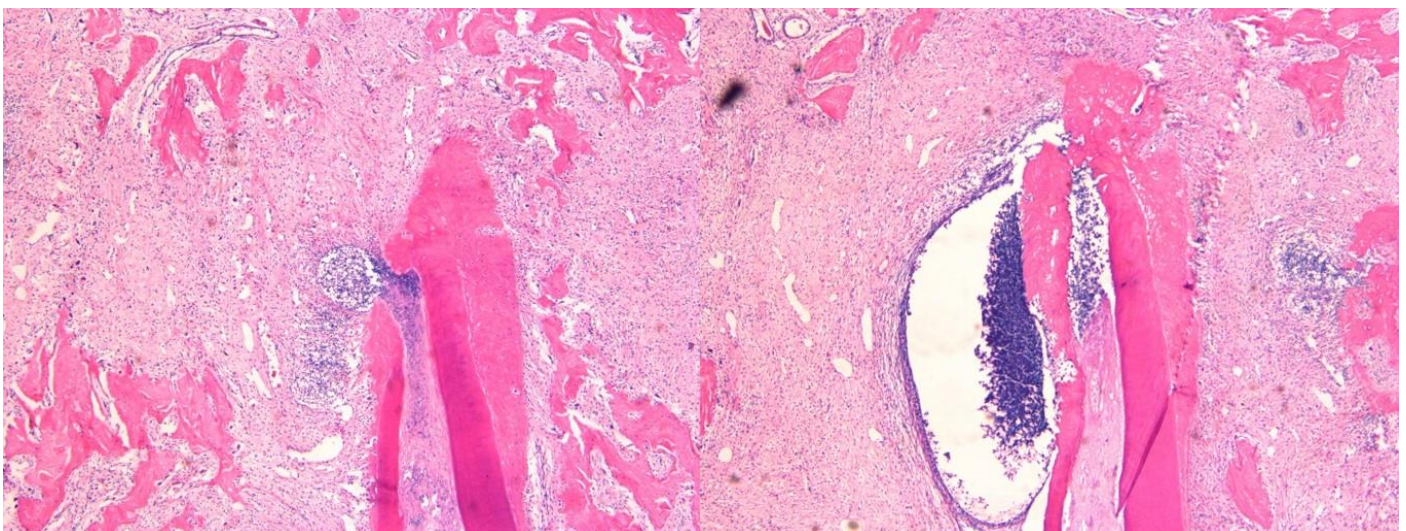


Figura 4 - Imagens representativas de espécime do grupo AT+IE: Aspecto microscópico panorâmico do terço apical da raiz dentária evidenciando presença de inflamação, desorganização do ligamento periodontal, área de reabsorção óssea, evidenciando presença de infiltrado inflamatório moderado de predominância crônica e áreas localizadas de concentração celular de polimorfo-nucleares [100x - H.E.].

5. Discussão

As doenças cardiovasculares ateroscleróticas são responsáveis por cerca de 30% de morbidade e mortalidade em todo o mundo (Ridker et al., 2008). A aterosclerose é uma doença sistêmica de origem inflamatória (Verma et al., 2002; Libby, 2002; Ross, 1999), que pode potencializar a inflamação já estabelecida em um sítio local, assim como gerar outras desordens sistêmicas. Isso se deve ao fato de que ocorre um aumento da biossíntese de mediadores da inflamação (Allahverdian et al., 2012) e dessa forma contribui também para um aumento desses mediadores pró inflamatórios em tecido periapical, quando esse não se encontra em homeostase.

No presente estudo, a aterosclerose foi induzida no início do período experimental, por meio de três métodos associados, para garantir que a doença fosse instalada de maneira eficaz. Uma amarra foi confeccionada na carótida (Wang, 2015) a fim de causar uma estenose proposital, pois estudos anteriores comprovaram que essa manobra é capaz de causar uma injúria aguda no vaso sanguíneo, permitindo assim, que ocorra o desencadeamento de um processo inflamatório, levando a disfunção endotelial rápida em um curto período de tempo (Nam, 2009). Estudos anteriores indicam que a inflamação (Siegel et al., 2013) e o estresse oxidativo (Hort et al., 2011) são os principais causadores da aterosclerose, pois induzem a deposição de materiais gordurosos, cálcio e compostos fibrosos, que levam ao espessamento da parede arterial (Lu e Daugherty 2014).

Um dia após o procedimento cirúrgico, os ratos receberam por dois dias, uma dose em alta concentração de Vitamina D3, que a partir de uma vitaminose, gera uma alta concentração plasmática de cálcio, favorecendo a calcificação dos ateromas (Wang, 2015).

De acordo com diversos estudos epidemiológicos, a administração sistêmica contínua de uma dieta contendo alto teor de gordura é considerado um fator de risco para as doenças cardiovasculares, pois quantidades excessivas de lipídeos no organismo, são capazes de gerar um desequilíbrio metabólico, favorecendo o acúmulo de gordura sobre e no interior das paredes das artérias, desencadeado pelo recrutamento de células imunes, aumento da produção de citocinas e consequentemente ruptura da parede (Zhou, 2011). A administração de uma dieta rica em gordura por 60 dias, de acordo com estudos anteriores, é capaz de proporcionar um aumento nos níveis séricos de lipídeos, que são capazes de gerar um desequilíbrio metabólico, bem como favorecer o acúmulo de gordura sobre e no interior das paredes das artérias, gerando anormalidades morfológicas, incluindo espessamento da camada íntima da artéria, acúmulo de adipócitos, células endoteliais desorganizadas e formação de uma camada de células espumosas (Chen, 2014).

A infecção endodôntica foi desencadeada por meio da exposição pulpar de molares de ratos, resultando na periodontite apical, a partir de bactérias do meio oral. Essa exposição teve duração de 30 dias, pois é o período suficiente para resultar em desenvolvimento da periodontite apical e necrose pulpar (Cintra et al., 2014; Astolphi, 2013).

Coerente aos achados em estudos prévios na periodontia, nos quais sugerem uma possível relação entre as doenças periodontais com as doenças cardiovasculares (Bartova, 2014; Yu, 2015), estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou, em modelo animal, que alterações sistêmicas, como a diabetes, é capaz exercer efeitos nos tecidos periapicais, bem como as infecções endodônticas são capazes de modular os efeitos das doenças sistêmicas, de maneira bidirecional (Cintra, 2013; Cintra, 2014).

Com o intuito de investigar se há uma relação entre as infecções endodônticas crônicas com a aterosclerose, ao observar a análise histológica, nosso estudo constatou que a intensidade do infiltrado inflamatório nos tecidos periapicais foi semelhante nos grupos que apresentavam periodontite apical, apesar de um maior número de espécimes terem obtidos escores de infiltrado severo no grupo AT+IE (Tabela 5). Este aspecto indica a necessidade de se verificar períodos anteriores ao de 30 dias com o intuito de se observar o perfil inflamatório no estágio inicial da periodontite apical. Por outro lado, a reabsorção óssea junto aos tecidos periapicais foi maior no grupo em que tínhamos a associação da periodontite apical com a aterosclerose em comparação ao grupo que apresentava somente periodontite apical. Este achado indica que houve um desenvolvimento mais acelerado da periodontite apical no grupo com Aterosclerose.

Assim como já está bem explorado por estudos realizados na periodontia, que mostram a forte associação entre as infecções periodontais com a aterosclerose, como a constatação de que a infecção gerada pelo principal patógeno periodontal, *P. gingivalis*, promove a aceleração da formação da placa aterosclerótica por modulação da resposta imune inata (Hayashi C, 2010) ou também que a infecção oral crônica suscitada por esse patógeno resulta em aumentos significativos na reabsorção óssea oral, causa inflamação aórtica, e que bactérias viáveis do epitélio oral, podem ser encontradas na aorta, causando o desenvolvimento da placa (Velsko IM, 2014). Nossos resultados comprovam que a aterosclerose influencia no desenvolvimento da periodontite apical, por meio do aumento da degradação da matriz extracelular e reabsorção óssea.

6 . Conclusão

A partir dos resultados do nosso estudo, podemos concluir que a presença da aterosclerose foi capaz de exacerbar a perda de estrutura óssea na região periapical decorrente da infecção endodôntica.

7. Referências

1. Astolpho RD, Curbete MM, Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, Prieto AK, Cintra LT, Bomfim SR, Ervolino E, Sumida DH. Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. *Journal of Endodontics*. V39, n.5, p648-52. May.2013.
2. Astolpho RD, Curbete MM, Chiba FY, Cintra LT, Ervolino E, da Mota MS, Antoniali C, Garbin CA, Sumida DH. Periapical Lesions Decrease Insulin Signaling in Rat Skeletal Muscle. *Journal of Endodontic*. V41, n.8, p1305-10. Aug. 2015.
3. Azuma MM, Gomes-Filho JE, Prieto AKC, Samuel RO, de Lima VMF, Sumida DH, Ervolino E, Cintra LTA. Diabetes increases interleukin-17 levels in periapical, hepatic, and renal tissues in rats. *Arch Oral Biol*, Nv83, p.230-235, 2017.
4. Bartova J, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Mysak J, Prochazkova J, Duskova J, Janatova T, Podzimek S. Periodontitis as a risk factor of atherosclerosis. *J Immunol Res*. V.2014, n.2014, Mar.2014.
5. Bouchi R, Takeuchi T, Akihisa M, Ohara N, Nakano Y, Nishitani R, Murakami M, Fukuda T, Fujita M, Minami I, Izumiyama H, Hashimoto K, Yoshimoto T, Ogawa Y. High visceral fat with low subcutaneous fat accumulation as a determinant of atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetes*. V14,n.1, p.136. Oct 2015.
6. Cintra LT, da Silva Facundo AC, Azuma MM, Sumida DH, Astolpho RD, Bomfim SR, Narciso LG, Gomes-Filho JE. Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats. *Clinical Oral Investig*. V17, n.6, p1595-9, Jul 2013 (a)
7. Cintra LT, Facundo ACS, Valentim D, Prieto AKC, Silva CO, Sumida DH, Bomfim SRM, Dezan-Junior E, Gomes-Filho JE. Effect of Oral Infections on Serum Creatinine Levels in Diabetic Rats. *International Journal of Diabetes and Clinical Research*. V.1, n.3, p1-6. 2013 (b).
8. Cintra LT, Facundo ACS, Prieto AKC, Sumida DH, Narciso LG, Bomfim SRM, Silva C, Dezan-Junior E, Gomes-Filho JE. Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. *Journal of Endodontics* V40, n8, p 1139-44. Aug 2014 (a).
9. Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, de Lima VM, Sumida DH, Coclete GA, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Apical periodontitis and periodontal disease increase serum L-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. *Clinical Oral Investigations*. V18, n.9, p.2123-8, Dec. 2014 (b).
10. Cintra LT, Samuel RO, Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Bomfim SR, Souza JC, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. *International Endodontic Journal*. V.47, n.3, p.228-37, Marc. 2014 (c).
11. Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, de Queiróz AO, Ervolino E, Sumida DH, de Lima VM, Gomes-Filho JE. Multiple Apical Periodontitis Influences Serum Levels of Cytokines and Nitric Oxide. *Journal Endodontics*. V.42, n.5, p.747-51, May 2016 (b).

12. Cintra LT, Samuel RO, Prieto AK, Sumida DH, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Oral health, diabetes, and body weight. *Arch Oral Biol.* n.73, p.94-99, Jan 2017.
13. Chistiakov DA, Bobryshev YV, Orekhov AN⁴. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *J Cell Mol Med.*V.23, Oct 2015.
14. Colic M, Gazivoda D, Vasilijic S, Vucevic D, Lukic A. Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. *Journal Oral Pathology & Medicine.* V.39, n.9, p.690-6, Oct 2010.
15. Dugas NN, Lawrence HP, Teplitsky PE, Pharoah MJ, Friedman S. Periapical health and treatment quality assessment of root-filled teeth in two Canadian populations. *International Endodontic Journal.* V.36, n.3, p.181-92, Mar 2003.
16. Etemadifar R, Konorizadeh S, Zarei A, Farshidi H, Sobhani A. Relationship between periodontal status and Creactive protein and interleuckin 6 levels among atherosclerotic patients in Bandar Abbas, Iran in 2014. *Electron Physician,* V.7, n.1, p.1010-6, Mar 2015.
17. Fan R, Sun B, Zhang CF, Lü YL, Xuan W, Wang QQ, Yin XZ. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin expression in chronic apical periodontitis: possible association with inflammatory cells. *Chinese Medical Journal.* V.124, n14, p.2162-6, Jul 2011.
18. Graves D T, T. Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of Oral Microbiology.* V17, n.3, Jan 2011
19. Hayashi C, Madrigal AG, Liu X, Ukai T, Goswami S, et al. Pathogen-Mediated Inflammatory Atherosclerosis Is Mediated in Part via Toll-Like Receptor 2-Induced Inflammatory Responses. *Jounal Innate Immunology.* V 2. P.334–343, 2010.
20. Higashi Y, Goto C, Hidaka T, Soga J, Nakamura S, Fujii Y, Hata T, Idei N, Fujimura N, Chayama K, Kihara Y, Taguchi A, Oral infection- inflammatory pathway, periodontitis, is a risk factor for endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis.* V.206, n.2, p.604-10, Oct 2009.
21. Hort MA, Straliootto MR, Netto PM, Da Rocha JBT, De Bem AF, Ribeiro-Do-Valle RM. Diphenyl diselenide effectively reduces atherosclerotic lesions in LDLr mice by attenuation of oxidative stress and inflammation. *Journal Cardiologyv Pharmacology.*V. 58, n.1, p.91-101, 2011.
22. Kudo C, Shin WS, Minabe M, Harai K, Kato K, Seino H, Goke E, Sasaki N, Fujino T, Kuribayashi N ,Pearce YO, Taira M, Maeda H, Takashiba S.. Analysis of the relationship between periodontal disease and atherosclerosis within a local clinical system: across-sectional observational pilot study. *Odontology.* v.103, n.3, p.314-2, Sep 2015.
23. López NJ. Periodontal treatment may reduce levels of systemic inflammation markers associated with atherosclerotic profile. *J Evid Based Dent Pract* V.14, n.2, p.53-5. Jun 2014.
24. Lu H, Daugherty A. Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.* V.25, n.2, p.157-158, 2014.

25. Lukic A, Danilovic V, Petrovic R. Comparative immunohistochemical and quantitative analysis of inflammatory cells in symptomatic and asymptomatic chronic periapical lesions. *Vojnosanit Preg* V.65, p.435-40, 2008
26. Marotta PS, Fontes TV, Armada L, Lima KC, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Type 2 diabetes mellitus and the prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment in an adult Brazilian population. *Journal of Endodontics*. V.38, n.3, p.297-00, Mar 2012.
27. Nair P N. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. v.15, n.6, p.348-381. Nov. 2004.
28. Nam D, Ni CW, Rezvan A, Suo J, Budzyn K, Llanos A, Harrison D, Giddens D, Jo H. Partial carotid ligation is a model of acutely induced disturbed flow, leading to rapid endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. V.297, n.4, p.1535-43, Oct 2009.
29. Park GM, Cho YR, Lee SW, Yun SC, Gil EH, Kim DW, Kim CJ, Cho JS, Park HW, Her SH, Kim YH, Yang DH, Kang JW, Lim TH, Jung CH, Koh EH, Lee WJ, Kim MS, Lee KU, Kim HK, Choe J, Park JY. Family history of diabetes and the risk of subclinical atherosclerosis. *Diabetes Metab*. V.8, Oct 2005.
30. Pereira RF, de Oliveira da Mota MS, de Lima Coutinho Mattera MS, Tsosura TV, Chiba FY, Garbin CA, Ervolino E, Cintra LT, Okamoto MM, Machado UF, Sumida DH. Periapical lesions decrease Akt serine phosphorylation and plasma membrane GLUT4 content in rat skeletal muscle. *Clin Oral Investig*. V. 20,n.7,p.1625-30, Sep 2016.
31. Pereira RF, Cintra LTA, Tessarin GWL, Chiba FY, de Lima Coutinho Mattera MS, Scaramele NF, Tsosura TV, Ervolino E, de Oliveira SHP, Sumida DH. Periapical Lesions Increase Macrophage Infiltration and Inflammatory Signaling in Muscle Tissue of Rats. *J Endod*. V.43, n. 6, p.982-988, Jun 2017.
32. Prieto AKC, Gomes-Filho JE, Azuma MM, Sivieri- Araujo G, Narciso LG, Souza JC, Ciarlini PC, Cintra LTA. Influence of Apical Periodontitis on Stress Oxidative Parameters in Diabetic Rats. *J Endod*.V.43,n.10, p.1651-1656, Oct 2017.
33. Ridker P M, Danielson E, Francisco A H, Genest F J, Gotto, A M jr, John J P. . Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C - reactive protein. *N Engl J Med*. V.359, p.2195-2207, 2008.
34. Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*, v.340, n.2, p.115-126, Jan. 1999.
35. Rufail ML, Schenkein HA, Koertge TE, Best AM, Barbour SE, Tew JG, van Antwerpen R. Atherogenic lipoprotein parameters in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontal Res*. V.42, n.6, p.495-502, Dec 2007.
36. Rupf S, Kannengiesser S, Merte K, Pfister W, Sigusch B, Eschrich K. Comparison of profiles of key periodontal pathogens in periodontium and endodontium. *Endod Dent Traumatol*. V.16, n.6, p. 269-75, 2000.

37. Samuel RO, Gomes-Filho JE, Azuma MM, Sumida DH, de Oliveira SHP, Chiba FY, Bonfim SRM, Ciarline PC, Narciso LG, Cintra LTA. Endodontic infections increase leukocyte and lymphocyte levels in the blood. *Clin Oral Investig*. Oct 11, 2017.
38. Siegel D, Devaraj S, Mitra A, Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Jialal I. Inflammation, atherosclerosis, and psoriasis. *Clin. Rev. Allergy Immunol*. V.44, n.2, p.194-204, 2013.
39. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*.V.86, p. 306-19, 2007.
40. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Alves FR, Campos LC. Periradicular status related to the quality of coronal restorations and root canal fillings in a Brazilian population. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. v.100, n.3, p.369-74. Sep.2005.
41. Steinberg D. Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis. *J Intern Med*. V.233, n.3, p.227-32, Mar 1993.
42. Tapashetti RP, Guvva S, Patil SR, Sharma S, Pushpalatha HM. C-reactive Protein as Predict of Increased Carotid Intima Media Thickness in Patientswith Chronic Periodontitis. *Journal of International Oral Health*. V.6, n.4, p.47-52, Jul 2014.
43. Unruh D, Srinivasan R, Benson T, Haigh S, Coyle D, Batra N, Keil R, Sturm R, Blanco V, Franco RS, Palascak M, Tong W, Chatterjee T, Hui DY, Davidson WS, Aronow BJ, Kalfa T, Manka D, Peairs A, Blomkalns A, Fulton DJ, Brittain JE, Weintraub NL, Bogdanov VY. Red Blood Cell Dysfunction Induced by High Fat Diet: Potential Implications for Obesity-Related Atherosclerosis. *Circulation*. V14, Oct 2015.
44. Velsko IM, Chukkapalli SS, Riviera MF, Lee JY, Chen H, Zheng D, Bhattacharyya I, Gangula PR, Lucas AR, Kesavalu L. Active invasion of oral tissues by *Porphyromonas gingivalis* in mice casually linksperiod ontitis and atherosclerosis. *Plos One*. V16, n.9, p. 97811, May 2014.
45. Wang J, Wang L, Yang H, You Y, Xu H, Gong L, Yin X, Wang W, Gao S, Cheng L, Liang R, Liao F. Prevention of atherosclerosis by Yindan Xinnaotong capsule combined with swimming in rats. *BMC Complement Altern Med*. V.8, n.5, p. 109, Apr 2015.
46. Xiong H, Wei L, Peng B. Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions. *Journal of Endodontics*.v.35, n.2, p.16-20, Feb. 2009.
47. Yu YH, Chasman DI, Buring JE, Rose L, Ridker PM. Cardiovascular risks associated with incident and prevalent periodontal disease. *J Clin Periodontol*. V.42, n.1, p.21-8, Jan 2015.
48. Zhang X, Peng B. Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. *Journal of Endodontics*. v.31, p.574 –7, Aug. 2005.
49. Zhou BR, Pan Y, Zhai ZM. Fibrinogen and P-selectin expression in atherosclerosis model of Sprague Dawley rat. *Chin Med J*. V. 124, p.3768-3772, 2011.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Inter-relação entre a periodontite apical e a aterosclerose. Estudo local e sistêmico em ratos Wistar", Processo FOA nº 00358-2016, sob responsabilidade de Luciano Tavares Angelo Cintra apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 01 de junho de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 14 de Junho de 2018.

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

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Interrelationship between apical periodontitis and atherosclerosis. Local and systemic study in Wistar rats", Protocol FOA nº 00358-2016, under the supervision of Luciano Tavares Angelo Cintra presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 01, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: June 14, 2018.

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


Prof. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

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