



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Taís Gonçalves Costa

Influência da periodontite apical no perfil hematológico de
ratos Wistar portadores de Insuficiência Renal Aguda

ARAÇATUBA-SP

2018

Taís Gonçalves Costa

Influência da periodontite apical no perfil hematológico de
ratos Wistar portadores de Insuficiência Renal Aguda

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
2018

Dedicatória

*Á Deus e minha família, que tanto fizeram por mim e
sempre estiveram ao meu lado.*

Agradecimentos

À Deus, aquele que me deu forças para continuar mesmo quando tudo parecia perdido e sem solução. Aquele que confortou meu coração durante momentos de tristeza e angústia e me mostrou o caminho certo quando parecia não ter certo e errado. Me deu forças para aguentar a distância de minha família e todos obstáculos presentes, com certeza sem Ele não teria conseguido.

Aos meus pais, Claudinei e Rosimeire, que jamais mediram esforços para me ver feliz, colocaram os meus sonhos à frente dos seus e nunca me deixaram faltarnada. Queria que vissem pelos meus olhos a admiração que tenho por vocês e espero um dia poder retribuir tudo o que me proporcionaram. Eu sou e serei eternamente grata a vocês!

À minha irmã, Thainá, que além de irmã é minha confidente e companheira. Agradeço pela ajuda nos momentos que pareciam impossíveis de melhorar, pelos inúmeros conselhos e puxões de orelha, pela transparência em tudo que me diz e faz por mim. Eu realmente entendo como o irmão mais velho pode fazer a diferença, você é o meu exemplo e minha vida não teria significado sem você, uma pela outra sempre.

Ao meu cunhado, Ralf, que me acompanhou durante todos esses 5 anos e facilitou demais minha trajetória para que se concluísse como o planejado.

À todos os professores que fizeram parte da minha graduação. Os ensinamentos de todos vocês me enriqueceram e fizeram com que eu enxergasse a Odontologia com outros olhos. Serei eternamente grata.

Ao meu Professor e Orientador, Luciano Tavares Angelo Cintra, pelo privilégio de ser sua orientada, por todo o ensinamento e conhecimento compartilhado. É incrível a excelência com que executa seu trabalho, o amor pela profissão e presença na vida de seus orientados. Espero um dia me sentir realizada nesse nível e poder ser um pouco do profissional que o senhor é. Minha sincera gratidão!

Aos Professores Celso KoogiSonoda e Leonardo Perez Faverani, que com toda dedicação, didática e conhecimento contribuíram imensamente para minha graduação. Meus sinceros agradecimentos!

À querida mestrande e amiga, Carol Barros, que esteve ao meu lado durante os momentos mais difíceis da IC, se mostrando sempre prestativa e não medindo esforços para que eu cumprisse todas as metas com facilidade. Você foi fundamental para a conclusão desse projeto e do meu tcc! Saiba que serei eternamente grata por tudo que fez por mim e a levarei sempre no coração com muito carinho. Te desejo tudo de melhor

Às minhas amigas de graduação, Marina Ottoni que se tornou minha irmã de coração e pude ter o prazer de fazer parte de sua vida durante esses 5 anos. Nunca imaginei ter essa conexão com alguém tão diferente e igual a mim ao mesmo tempo, espero ter acrescentado à você igual você a mim pois sem sua amizade minha caminhada até aqui não teria sido tão maravilhosa. À Elisa Furquim pelas palavras lindas e sábias de sempre, que veio pra me acrescentar e tomar uma parte de meu coração, saiba que sempre a terei com muito carinho. À Juliana Salata por se fazer presente nesses 5 anos, sempre entendendo meus momentos com um sorriso no rosto e um ombro de apoio. Você foi de grande

importância para a minha trajetória. À Yasmim Sivieiro, que sempre esteve de prontidão para me ajudar no que fosse necessário. Você é muito especial para mim! À Beatriz Pirovani, Raíssa, Letícia e Clarissa pela amizade nesses últimos anos.

Às minhas companheiras de apartamento durante 4 anos, Ana Carolina Brasil e Patrícia Silveira, apesar das diferenças sempre demos as melhores risadas, tivemos os melhores momentos, as melhores histórias. Como não ser feliz por ter tido a oportunidade de tê-las em minha vida?

Às minhas novas companheiras de apartamento, Camila Kawata e Anelise Ishikawa, que me acolheram no lar de vocês e se mostraram grandes amigas. Vocês terão sempre um lugar especial no meu coração.

Às minhas amigas de longa data, Karen Lima e Josi Duarte, que estiveram presentes em alguns poucos episódios da minha graduação mas sei que em qualquer momento que precisasse vocês estariam de braços abertos para me ajudar e me apoiar. Amo vocês e sinto saudades.

Aos pós-graduandos da disciplina de Endodontia, Amanda, Letícia Citelli, Pedro, Leopoldo, Renan, por me ajudarem prontamente sempre que precisei. Muito obrigada mesmo, de coração! Foi um prazer conviver com vocês!

E, por fim, agradeço especialmente ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC pela bolsa concedida.

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”

Hipócrates

Costa, TG. **Influência da periodontite apical no perfil hematológico de ratos Wistar portadores de Insuficiência Renal Aguda**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência da Periodontite apical (PA) no perfil hematológico de ratos portadores de insuficiência renal aguda (IRA). Foram utilizados 32 ratos divididos em 4 grupos (n=8): Grupo C - ratos controle; Grupo PA - ratos portadores de PA; Grupo IRA - ratos portadores de IRA; Grupo IRA+PA - ratos portadores de IRA e PA. A IRA foi induzida por meio de uma aplicação diária de Gentamicina (100mg/Kg/dia) por 8 dias, via intraperitoneal. A PA foi induzida por meio de exposição pulpar dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito e foi confirmada radiograficamente após 15 dias. Decorrido este período, foi feita a coleta do tecido hematológico, por meio de punção cardíaca, para análise dos 12 parâmetros do hemograma (Hemácias, Volume Globular, Hemoglobina, VCM, CHCM, Leucócitos, Neutrófilos, Linfócito, Monócito, Eosinófilo, Basófilo, e Proteína Plasmática Total). Os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística ($p<0,05$). Na análise radiográfica foi observada reabsorção óssea junto ao periápice dos dentes submetidos à exposição pulpar. No sangue foi observado aumento significativo de leucócitos, linfócitos e neutrófilos ($p<0,05$), nos grupos IRA e IRA+PA em relação ao grupo controle. Além disso, houve diminuição da série vermelha ($p<0,05$) nos grupos IRA e IRA+PA. O VCM reduziu significativamente ($p<0,05$) principalmente no grupo IRA+PA. Foi concluído que a presença de múltiplos focos de periodontite apical quando associada à IRA, levam a alterações de fatores no perfil sanguíneo que causam distúrbios no metabolismo. Relevância clínica: A presença de infecções endodônticas pode interferir no perfil sanguíneo, alterando a saúde sistêmica.

Palavras-chave: Periodontite apical, Lesão Renal Aguda, Hemograma.

Costa, TG. **Influence of apical periodontitis on the hematological profile of Wistar rats with Acute Renal Failure. 2018.**Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

Abstract

The objective of this study was to verify the influence of apical periodontitis (AP) on the hematological profile of rats with acute renal failure (ARF). Thirty two rats were divided into four groups (n = 8): Group C - control rats; AP group - rats with apical periodontitis; Group IRA – rats with acute kidney injury; IRA + AP group - rats with acute kidney injury and apical periodontitis. IRA was induced by daily application of Gentamicin (100mg/kg/day) for 8 days intraperitoneally. The AP was induced by means of pulp exposure of the first and second upper and lower right molars and was confirmed radiographically after 15 days. After this period, hematological tissue was collected by means of a cardiac puncture for the analysis of the 13 hemogram parameters (Hemacric, Globular Volume, Hemoglobin, MCV, MCHC, Leukocytes, Neutrophils, Lymphocytes, Monocytes, Eosinophils, Basophils and Total Plasma Protein). The data were tabulated and subjected to statistical analysis ($p < 0.05$). The radiographic analysis was performed through bone resorption along with the exposure of the teeth submitted to the pulp exposure. The increase was significant in leukocytes, lymphocytes and neutrophils, ($p < 0.05$), in the ARF and ARF + AP groups in relation to the control group. In addition, the red series in the IRA and IRA + AP groups. The MCV significantly reduced ($p < 0.05$), mainly in the ARF + AP group. A study was performed of multiple foci of apical periodontitis when associated with ARI, leading to changes in parameters in the blood profile that cause disturbances in the metabolism. Clinical relevance: the presence of endodontic infections can interfere with the blood profile, altering systemic health.

Keywords: Apical Periodontitis, Acute Kidney Injury, Hemogram.

SUMÁRIO

1 -	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2 -	PROPOSIÇÃO	14
3 -	MATERIAL E MÉTODOS	14
4 -	RESULTADOS	18
5 -	DISCUSSÃO	20
6 -	CONCLUSÃO	23
7 -	REFERÊNCIAS	23
8 -	ANEXOS	29

1 Introdução

A infecção endodôntica proporciona o desenvolvimento da periodontite apical (Colicetal. 2010) que é caracterizada, histologicamente, por um tecido granulomatoso infiltrado por diferentes tipos de células inflamatórias (Lukicet al. 2008). Radiograficamente é possível identificar a periodontite apical por meio da observação de área radiolúcida junto ao periápice dos dentes portadores da infecção endodôntica. Estas áreas são comumente chamadas de lesões periapicais e são formadas devido à resposta do hospedeiro ao estímulo antigênico oriundo dos canais radiculares infectados (Xionget al. 2009). A resposta do hospedeiro envolve o recrutamento de diferentes células inflamatórias e a participação de uma extensa rede de mecanismos imunológicos, incluindo a produção de citocinas (Xionget al. 2009;Colic et al. 2010). Algumas destas citocinas são sintetizadas em resposta à presença de bactérias e seus produtos, os quais induzem e mantêm a resposta inflamatória (Xionget al. 2009;Colic et al. 2010), que promovem a degradação da matriz extracelular e posteriormente a reabsorção óssea (Nair 2004; Graves et al. 2011).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado de forma intensa a influência da infecção endodôntica sobre a saúde sistêmica (FAPESP 2012/02083-8; 2012/02565-2;2013/26390-0; 2014/10324-0; 2015/03054-0; 2016/08005-0). Empregando modelo animal padronizado,verificamos 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), hemoglobina glicada (Cintra et al. 2014c), mediadores pró-inflamatórios como a IL-17 (Cintra et al., 2014a), além de alterar alguns parâmetros do hemograma, destacando-se a série branca (Cintra et al. 2014b), bem como é capaz de alterar o sinal insulínico do sangue e do tecido muscular (Astolphi et al. 2015; Astolphi et al. 2013).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que a presença de quatro periodontites apicais foi capaz de aumentar os níveis de triglicérides (Azumaet al. 2018), células inflamatórias (Azuma et al. 2017), e mediadores pró-inflamatórios, como IL-17, IL-6, TNF- α , IL-23 e óxido nítrico (Cintra

et al. 2016b) no tecido hematológico de ratos, o que sugere que a presença de múltiplos focos da infecção endodôntica exercem uma influência mais significativa e podem comprometer a homeostase de um indivíduo.

Neste sentido, o objetivo do nosso grupo de pesquisa é estudar a possível relação bidirecional entre a infecção de origem endodôntica, caracterizada pela periodontite apical, e as doenças e/ou alterações sistêmicas.

Para este projeto, elegemos a Insuficiência Renal Aguda (IRA) como objeto do estudo, pois os rins são órgãos complexos, essencialmente reguladores, que exercem uma gama de funções primordiais para a homeostasia orgânica. A maioria destas funções envolve uma combinação de excreção e reabsorção de substâncias, produzindo um balanço de entrada e saída. É responsabilidade da função renal regular o equilíbrio hídrico e eletrolítico; controlar a pressão sanguínea, a produção de glóbulos vermelhos e a produção da vitamina D; excretar metabolitos; secretar substâncias bioativas como hormônios; e promover a manutenção do equilíbrio acidobásico (Eaton&Pooler 2006, Berne&Levi 2009).

A doença renal é um grave problema de saúde pública que atinge milhares de pessoas no Brasil e no mundo e acabam por desencadear a Insuficiência Renal Aguda (IRA) (Nunes et al. 2010). A IRA é uma complicação que ocorre em cerca de 5% das hospitalizações e até 30% das internações em UTI. A Necrose Tubular Aguda (NTA) é responsável por mais de 50% da IRA em pacientes hospitalizados e mais de 76% dos pacientes em UTI (Nunes et al. 2010), possuindo taxas de mortalidade entre 15% e 60% nesses pacientes (Kellum 2008).

Uma das formas de se desenvolver a IRA é a exposição a um agente nefrotóxico. As IRAs nefrotóxicas correspondem a 30% dos casos de lesão renal, sendo a nefrotoxicidade um efeito indesejável de diversos fármacos de uso rotineiro (Hosohata 2016). As drogas que causam toxicidade tubular atuam alterando a função mitocondrial, interferindo no transporte tubular, aumentando estresse oxidativo e a formação de radicais livres (Zager 1997; Markowitz et al. 2005). Dentre as drogas associadas a este mecanismo patogênico da lesão, estão os aminoglicosídeos, anfotericina B, quinolonas, rifampicina, adefovir, cidofovir,

tenofovir, DAINES, cisplatina, contrastes radiológicos, dentre outras (Cynthia 2008). Assim, é possível afirmar que a utilização de antibióticos nefrotóxicos, sozinhos ou em combinação com outros fármacos são causas principais da IRA (Mehta et al. 2004; Pannu & Nadim 2008).

Aminoglicosídeos são antimicrobianos usados principalmente no tratamento de pacientes com infecções graves causadas por bactérias gram-negativas aeróbias, porém com alto poder nefrotóxico (Appel 1977). Os principais representantes deste grupo são gentamicina, amicacina, estreptomicina e tobramicina. A nefrotoxicidade induzida por gentamicina está relacionada com a dose e a duração do tratamento e caracteriza-se por necrose tubular (Rodriguez-Barbero et al. 1992), decréscimos acentuados na taxa de filtração glomerular (TFG), no coeficiente de ultrafiltração (KF) e no fluxo de plasma glomerular (Schor et al. 1981). Ressalta-se que o uso na rotina terapêutica de gentamicina (80 mg/kg) por mais de sete dias, tem sido uma causa comum de nefrotoxicidade em aproximadamente 30% dos pacientes (Derakhshanfar et al. 2007). Devido ao alto grau nefrotóxico da gentamicina, ela tem sido a droga de escolha para a indução da IRA em modelos animais (Farombi e Ekor 2006; Tavafi e Ahmadvand 2011; Aygun et al. 2012; Zager 2007; Yarijani et al. 2016; Valipouret al. 2016).

O hemograma é um exame básico e de excelência para verificação inicial de possíveis alterações sistêmicas, pois permite a avaliação da série vermelha, série branca e plaquetas, tanto quantitativamente quanto qualitativamente (Odagiriet al. 2011). A análise por hemograma é comumente utilizada em modelo animal, particularmente no rato, por possibilitar a padronização dos espécimes e ser representativa para a correlação com estudos em humanos (Azeez et al. 2010; López et al. 2011).

Diante do exposto, nós padronizamos o modelo da IRA em nosso laboratório por meio da administração de gentamicina para o estudo da relação bidirecional desta enfermidade com as infecções orais, particularmente com a periodontite apical e julgamos importante observar as possíveis alterações nos diferentes parâmetros do hemograma.

2 Proposição

Analisar o perfil hematológico, por meio da análise de 12 parâmetros no hemograma (Hemácias, Volume Globular, Hemoglobina, VCM, CHCM, Leucócitos, Neutrófilos, Linfócito, Monócito, Eosinófilo, Basófilo e Proteína Plasmática Total) e identificar qual ou quais parâmetros foram alterados em função da presença da periodontite apical e da insuficiência renal aguda isoladas ou associadas.

3 Material e métodos

3.1 Material

- Animal

Foram utilizados 32 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 250g, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com quatro ratos por gaiola e 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 propostos neste estudo foram submetidos ao comitê de conduta ética em experimentação animal (Processo FOA nº 00373-2017).

- Drogas

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

O protocolo anestésico utilizado para o procedimento cirúrgico de indução da PA foi à base de Xilazina 2% (relaxante muscular, analgésico e sedativo, Xilazin, Syntec do Brasil LTDA – Cotia, São Paulo, Brasil – 10mg/ml) e à

base de Cloridrato de Cetamina a 10% (KetaminaAgener 10%, União Química Farmacêutica Nacional S/A – Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil – 80mg/Kg), via intramuscular. Para eutanásia, foi utilizado um anestésico via intraperitoneal à base de tiopental sódico (Thiopentax, Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda – Itapira, Brasil) na dosagem de 240mg por quilograma de peso corporal.

3.2 Métodos

3.2.1 Indução da IRA

Os animais receberam gentamicina (Gentatec®, 100 mg/Kg/dia) intraperitonealmente, por 8 dias, em dose única. Os ratos do grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento recebendo, no entanto, NaCl 0,9% (0,1 ml/100 g de peso corporal).

3.2.2 Indução da PA

A indução das periodontites apicais foi realizada no mesmo dia em que os animais receberam a última dose de Gentamicina. Para isso, os ratos foram anestesiados, via intra-muscular, com uma associação do sedativo à base de Xilazina 2% (Xilazin, Syntec do Brasil LTDA – Cotia, São Paulo, Brasil – 10mg/ml) e à base de Cloridrato de Cetamina a 10% (KetaminaAgener 10%, União Química Farmacêutica Nacional S/A – Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil – 80mg/Kg), via intramuscular.

As polpas dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito foram expostas, por meio de uma broca em aço carbono (Broca LnLongNeck- Maillefer, Dentsply) dotada de uma esfera na extremidade com 0,1mm de diâmetro. Desta forma, todas as exposições pulpares foram padronizadas com 0,1mm de diâmetro (Cintra et al., 2013a) e as polpas foram expostas na cavidade bucal por um período de 15 dias até o momento da eutanásia.

3.2.3 Formação dos grupos

Cada grupo foi composto por 8 animais de acordo com a intervenção realizada e podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1. Divisão dos diferentes grupos experimentais

Grupos	Descrição
C	Ratos Controle: • Injeções subcutâneas de NaCl 0,9% (0,1 ml/100g de peso corporal) durante 8 dias. • Anestesia para simular o mesmo trauma.
PA	Ratos com PA: • Injeções subcutâneas de NaCl 0,9% (0,1 ml/100g de peso corporal) durante 8 dias. • Indução a lesão periapical.
IRA	Ratos com IRA: • Injeções subcutâneas de Gentamicina* (100mg/kg/dia) durante 8 dias. • Anestesia para simular o mesmo trauma.
IRA+PA	Ratos com IRA e PA: • Injeções subcutâneas de Gentamicina* (100mg/kg/dia) durante 8 dias. • Indução a lesão periapical.

*Concentração de Gentamicina (Gentatec®) solução de 100mg/Kg/dia.

3.2.4 Coleta de Material para análise

Coleta de amostra de tecido hematológico

Após 15 dias da exposição pulpar, amostras de 5ml de sangue foram coletadas por punção cardíaca em campo aberto para a realização da dosagem de hemograma no mesmo dia.

Coleta da maxila e mandíbula e análise radiográfica

Após a coleta do sangue, os animais foram eutanasiados com uma sobredose anestésica com Tiopental Sódico, via intraperitoneal (Thiopentax, Cristália –

Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda – Itapira, Brasil - 240mg/Kg), conforme as Diretrizes da prática da eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013). As maxilas e mandíbulas contendo os molares portadores de infecção endodôntica foram removidas e radiografadas para confirmação da indução da periodontite apical (Cintra et al., 2013a).

3.2.5. Forma de análise dos resultados

Análise das amostras de tecido hematológico

Para realização do hemograma foi utilizado o aparelho ABX Vet (ABX Diagnostics) e o ABX VetPack composto por 3 reagentes. O ABX VET Pack, R3 é uma solução salina e tampão eletrolítica que permite a diluição e a preparação da amostra de sangue para análise. A presença de surfactante não iônico garante uma ótima dinâmica do fluxo em todos os sistemas hidráulicos do instrumento. A ação eletrolítica aceita a contagem das células por impedância. Este reagente diferencia populações morfológicas de leucócitos e é utilizado nos ciclos de enxágue e limpeza dos sistemas hidráulicos do instrumento. O ABX VET Pack, R2 decompõe a membrana celular dos eritrócitos. Pela adição do agente surfactante, a hemoglobina é libertada. Todo o ferro heme é oxidado e os complexos resultantes são quantificados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 530nm. O detergente presente na solução também diferencia populações morfológicas de leucócitos. ABX VET Pack, R1 utiliza a ação combinada de uma enzima proteolítica com um detergente para eliminar os resíduos de proteína e evitar que os tubos hidráulicos fiquem obstruídos e/ou bloqueiem o fluxo. Também é usado para decompor os acúmulos de proteína nas aberturas e câmaras de contagem. O volume globular foi analisado pelo método de microhematócrito e a contagem diferencial de leucócitos e análise morfológica de hemácias e leucócitos em esfregaços sanguíneos corados pelo corante Panótico rápido.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa SigmaPlot 12.0TM (Chicago, IL, USA). As variáveis que apresentaram distribuição normal passaram pelo teste ANOVA, enquanto que para comparações múltiplas dos resultados entre os grupos estudados, foi utilizado o teste Tukey. Sem 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. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade foi menor 5% ($p < 0,05$).

4 Resultados

4.1 Análise das radiografias

A presença da infecção endodôntica foi comprovada nos grupos PA e IRA+PA através de exame radiográfico após 15 dias da indução da infecção endodôntica. Foi possível observar reabsorção óssea junto ao periápice dos dentes que foram submetidos à exposição pulpar.

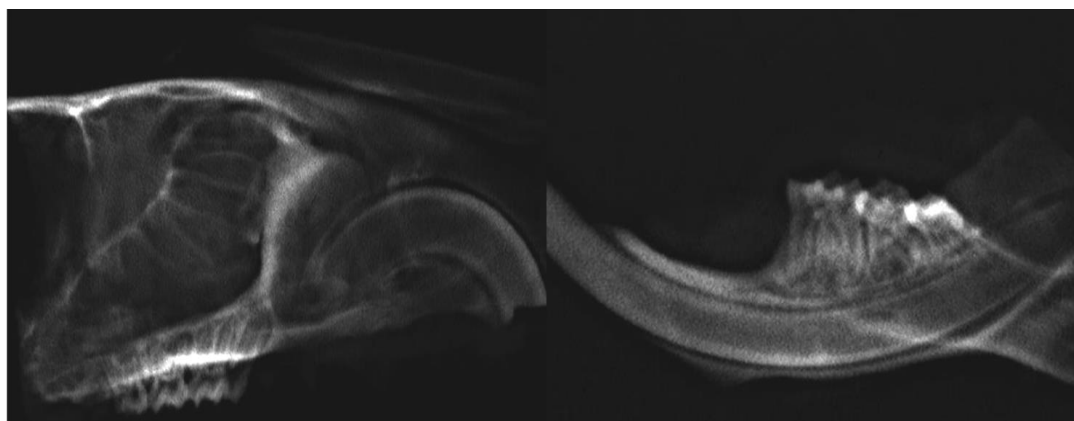


Figura 1. Imagens radiográficas da maxila e mandíbula, respectivamente, comprovando a presença de infecção endodôntica. Evidencia-se área radiolúcida junto aos periápices dos molares que tiveram suas polpas expostas.

4.2 Análise hematológica

As contagens sanguíneas foram realizadas para todos os animais, 15 dias após a indução da periodontite apical. O efeito da insuficiência renal aguda foi investigado sobre os parâmetros hematológicos dos animais com periodontite apical e, em seguida, comparados com os achados correspondentes dos animais normais. Os resultados da contagem do perfil hematológico completo e a contagem diferencial dos glóbulos brancos são mostrados na tabela 2.

Tabela 2. Média e desvio padrão (DP) dos parâmetros hematológicos

Parâmetros Hematológicos	Grupos			
	C	PA	IRA	IRA+PA
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6,47 $\pm$ 0,23 ^a	6,60 $\pm$ 0,24 ^a	5,73 $\pm$ 0,35 ^b	5,96 $\pm$ 0,65 ^b
Hemoglobina (g/dL)	14,76 $\pm$ 0,46 ^a	15,09 $\pm$ 0,58 ^a	13,01 $\pm$ 1,08 ^b	13,36 $\pm$ 1,60 ^b
Volume Globular(%)	44,25 $\pm$ 1,39 ^a	45,25 $\pm$ 1,67 ^a	39,38 $\pm$ 2,83 ^b	40,63 $\pm$ 4,47 ^b
MCV (fL)	68,42 $\pm$ 0,99 ^{ab}	68,56 $\pm$ 0,53 ^a	68,80 $\pm$ 1,03 ^b	67,45 $\pm$ 1,13 ^c
MCHC(%)	33,37 $\pm$ 0,48 ^a	33,34 $\pm$ 0,30 ^a	33,72 $\pm$ 0,24 ^a	33,42 $\pm$ 0,33 ^a
PTP (g/dL)	6,24 $\pm$ 0,45 ^a	6,71 $\pm$ 0,31 ^a	6,34 $\pm$ 0,65 ^a	6,24 $\pm$ 0,59 ^a
Leucócitos ($10^2/\mu\text{L}$)	81,63 $\pm$ 7,00 ^a	93,75 $\pm$ 9,14 ^b	104,00 $\pm$ 10,83 ^c	117,18 $\pm$ 7,23 ^c
Neutrófilos ($10^2/\mu\text{L}$)	16,00 $\pm$ 2,40 ^a	20,75 $\pm$ 5,34 ^{ab}	24,01 $\pm$ 7,88 ^b	25,07 $\pm$ 5,09 ^b
Linfócitos ($10^2/\mu\text{L}$)	61,18 $\pm$ 5,04 ^a	69,12 $\pm$ 5,10 ^b	68,99 $\pm$ 6,66 ^b	69,69 $\pm$ 4,90 ^b
Monócitos ($10^2/\mu\text{L}$)	2,80 $\pm$ 1,79 ^a	2,76 $\pm$ 1,55 ^a	2,74 $\pm$ 0,81 ^a	2,84 $\pm$ 0,65 ^a
Eosinófilos	1,09 $\pm$ 1,38 ^a	1,12 $\pm$ 0,99 ^a	1,05 $\pm$ 1,55 ^a	1,10 $\pm$ 0,82 ^a
Basófilos	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^a

*Mesmas letras nas linhas indicam ausência de diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Com relação à série vermelha, uma redução no número de hemácias, hemoglobina e volume globular foi observada nos grupos IRA e IRA+PA ($p < 0,05$), no entanto, não apresentaram diferenças significativas entre em si ($p > 0,05$). Já o volume corpuscular médio (MCV), apresentou valor significativamente reduzido no grupo IRA+PA quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Tanto a concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), quanto às proteínas plasmáticas totais (PTP), não apresentaram diferenças estatísticas entre os quatro grupos experimentais ($p > 0,05$).

Entre as células inflamatórias, um aumento significativo no número de leucócitos foi observado nos grupos PA, IRA e IRA+PA ($p < 0,05$), tendo maior aumento nestes dois últimos grupos (IRA e IRA+PA), no entanto, sem apresentarem diferença estatística entre eles ($p > 0,05$). Com relação aos valores de neutrófilos e linfócitos, apresentaram-se aumentados nos grupos PA, IRA e IRA+PA ($p < 0,05$), entretanto, não foram potencializados pela combinação destas duas patogenias ($p > 0,05$). Os valores obtidos de monócitos, eosinófilos e basófilos não apresentaram diferenças estatísticas entre nenhum grupo experimental ($p > 0,05$).

5 Discussão

Quanto à infecção oral, a periodontite apical foi induzida através da exposição pulpar de molares de ratos, permitindo uma posterior infecção bacteriana a partir do ambiente oral (Cintra et al. 2013; Cintra et al. 2014). No presente estudo, as polpas ficaram expostas em meio bucal por um período de 15 dias, período esse necessário para se ter um desenvolvimento inicial da periodontite apical e sua observação radiográfica, onde foi observado grande perda óssea na região apical dos dentes envolvidos. Em estudo anterior, a análise radiográfica das lesões revelou significativo aumento na perda óssea em ratos diabéticos em comparação com ratos não diabéticos com as mesmas infecções dentárias (Cintra et al. 2014).

A análise do perfil hematológico é um método utilizado para verificar a associação de infecções bucais com alterações sistêmicas e seus efeitos na saúde e homeostase corporal (Gkrania-Klotsaset al. 2010). Escolhemos o hemograma, um exame básico e de excelência para verificação inicial de possíveis alterações sistêmicas que permite a avaliação da série vermelha, série branca e plaquetas, tanto quantitativamente quanto qualitativamente (Odagiriet al. 2011). A análise por hemograma é comumente utilizada em modelo animal, particularmente no rato, por possibilitar a padronização dos espécimes e ser representativa para a correlação com estudos em humanos (Azeezet al. 2010; López et al. 2011).

A análise sanguínea é frequentemente utilizada para avaliar a presença de infecção ou inflamação, permitindo determinar quando a doença periodontal afeta os parâmetros hematológicos (Cintra et al., 2014). Estudos mostraram as diferenças nos parâmetros hematológicos de ratos normais comparados aos ratos diabéticos na presença ou não de periodontite apical e/ou doença periodontal (Cintra et al., 2014) e em múltiplos focos da periodontite apical (Taylor, GW; Borgnakke, WS., 2008). Em ratos diabéticos foi observado um aumento de linfócitos no sangue, principalmente em resposta à infecção bacteriana na periodontite apical (Samuel et al. 2018). O aumento no número de células inflamatórias resultantes da periodontite apical pode aumentar os efeitos deletérios das doenças autoimunes. Podem também ativar mediadores inflamatórios e aumentar o estresse oxidativo, exacerbando a inflamação em diferentes partes do corpo (Bianet al. 2012). Uma vez que as vias biológicas que ativam a inflamação e a autoimunidade são as mesmas, a presença de periodontite apical pode aumentar os efeitos deletérios das doenças autoimunes, e a patogênese da doença autoimune também pode potencializar os efeitos da periodontite apical em uma relação bidirecional (Gomes et al. 2013; Gomes et al. 2015).

Após a análise do perfil hematológico para investigar se houve relação entre a infecção endodôntica e a IRA, os resultados mostraram algumas alterações sanguíneas nos animais tanto com as doenças isoladas quanto associadas, quando foram comparados aos valores do grupo controle. Quanto à

série vermelha foi observado que as hemácias reduziram em todos os grupos, principalmente nos grupos IRA e IRA+PA enquanto que a hemoglobina e o volume globular tiveram redução apenas nos grupos IRA e IRA+PA. Alguns estudos também relataram uma redução dos glóbulos vermelhos e dos níveis de hemoglobina na presença de doença periodontal mais agressiva, sugerindo que a doença periodontal pode estar associada com a patogênese da anemia leve (Anand et al. 2013; Agarwal et al. 2009). Outros estudos hematológicos realizados em pacientes com doença periodontal mostraram contagem de eritrócitos baixa, baixos níveis de hemoglobina e baixo hematócrito em comparação com os níveis nos controles. A explicação mais provável para isso é que a inflamação periodontal pode afetar a eritropoiese (Yamamoto et al. 2011). O MCV apresentou-se significativamente reduzido no grupo IRA e, ainda mais, no grupo IRA+PA mostrando que este fator é agravado com a junção das duas patologias. O MCV define o volume das hemácias e é utilizado para classificar as anemias em normocítica, microcítica e macrocítica. Em estudo em humanos com insuficiência renal, foi visto que o volume corpuscular médio é baixo em relação aos valores normais, o que também pode ser atribuído a um déficit relativo de eritropoietina, uma vez que uma das funções do rim é a produção de glóbulos vermelhos (Alves e Gordan 2007).

Verificou-se uma prevalência de leucócitos principalmente no grupo IRA+PA, um aumento significativo de neutrófilos também no grupo IRA+PA e aumento de linfócitos em todos os grupos. Estudos anteriores verificaram que as infecções orais quando presentes, isoladas ou em associação com a diabetes, afetam os parâmetros hematológicos, causando aumento de leucócitos, neutrófilos e linfócitos (Cintra et al. 2014; Samuel et al. 2017). Resultados de estudos também confirmaram que a infecção endodôntica em múltiplos dentes pode levar à diminuição do nível de IL-4 no sangue, mas aumentam os níveis de linfócitos e de TNF- α . Características histológicas também confirmaram essa relação: além de aumento dos níveis de linfócitos no sangue, houve aumento dos níveis de linfócitos em resposta à infecção bacteriana em PA (Samuel et al. 2017).

A partir dos resultados obtidos, é possível afirmar que a infecção endodôntica e a insuficiência renal aguda quando presentes, isoladas ou associadas, podem influenciar no metabolismo e causar danos ao organismo. Esses resultados indicam que infecções locais como a periodontite apical, além de levar à alterações locais, pode também potencializar os efeitos causados pelas doenças sistêmicas.

6 Conclusão

Em conclusão, os resultados do nosso estudo mostraram que a presença de múltiplos focos de periodontite apical quando associada á insuficiência renal aguda, levam à alterações hematológicas que causam distúrbios no metabolismo dos ratos.

7 Referências

1. Agarwal N, Kumar VS, Gujjari SA. Effect of periodontal therapy on hemoglobin and erythrocyte levels in chronic generalized periodontitis patients: an interventional study. J Indian Soc Periodontol 13:6–11. 2009
2. Anand PS, Sagar DK, Ashok S, Kamath KP. Association of aggressive periodontitis with reduced erythrocyte counts and reduced hemoglobin levels. J Periodontal Res 49:719–728. 2013
3. Appel GB, Neu HC. The nephrotoxicity of antimicrobial Agents. New Engl J Med. 1977; 269-663.
4. Astolphi 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. J Endod. 2015 Aug; 41(8):1305-10.
5. Astolphi 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. J Endod. 2013 May; 39(5):648-52.

6. Alves, Maria Almerinda Ribeiro; GORDAN, Pedro A. Diagnóstico de anemia em pacientes portadores de doença renal crônica. J BrasNefrol, v.29, n.4, Supl.4, dez. 2007. Disponível em: . Acesso em: 16 dez. 2014.
7. Aygun FO, Akçam FZ, Kaya O, Ceyhan BM, Sutçu R. Caffeic acid phenethyl ester modulates gentamicin-induced oxidative nephrotoxicity in kidney of rats. Biological Trace Element Research. 2012; 145: 211-16.
8. Azeez OI, Oyagbemi AA, Oyeyemi MO, Odetola AA. Ameliorative effects of *Cnidioscolus aconitifolius* on alloxan toxicity in Wistar rats. Afr Health Sci. 2010 Sep;10(3):283-91.
9. Azuma MM, Gomes-Filho JE, Cardoso CBM, Pipa CB, Narciso LG, Bomfim SRM, Jacinto RC, Cintra LTA. Omega 3 Fatty Acids Reduce the Triglyceride Levels in Rats with Apical Periodontitis. Braz Dental J. 2018; 29(2):173-178.
10. Azuma MM, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Pipa CB, Cardoso CBM, Andrada, AC, Kawai T, Cintra LTA. Omega 3 fatty acids reduce bone resorption while promoting bone generation in rat periapical periodontitis. J Endod, 2017 n/a.
11. Berne, Levi. Fisiologia. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
12. Bian Z, Guo Y, Ha B, Zen K, Liu Y (2012) Regulation of the inflammatory response: enhancing neutrophil infiltration under chronic inflammatory conditions. J Immunol 188:844–853.
13. Cintra LT, da Silva Facundo AC, Azuma MM, Sumida DH, Astolphi RD, Bomfim SR, Narciso LG, Gomes-Filho JE. Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats. Clin Oral Investig. 2013a; 17:1595-9.
14. Cintra LT, Facundo ACS, Valentim D, Prieto AKC, Silva CO, Sumida DH, Bomfim SRM, Dezan-Junior E, Gomes-Filho JE. Effect of Oral Infection on Serum Creatinine Levels in Diabetic Rats. Int J Diabet Vasc Dis Res. 2013b; 1(3):1-6.
15. Cintra LT, da Silva Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Narciso LG, Mogami Bomfim SR, Oliveira e Silva C, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. J Endod. 2014a Aug;40(8):1139-44.
16. 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 IL-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. *Clin Oral Investig*. 2014b Dec;18(9):2123-8.

17. 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. *IntEndod J*. 2014c Mar;47(3):228-37.

18. 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. *JEndod*. 2016b May;42(5):747-51.

19. Cintra, LT; Samuel, RO; Facundo, AC; Prieto, AK; Sumida, DH; Bomfim, SR; et al. Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. *Int Endod J* 2014; 47:228-237.

20. Cintra, LT; da Silva Facundo, AC; Prieto, AK; Sumida, DH; Narciso, LG; Mogami Bomfim, SR; et al. Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. *J Endod* 2014; 40:1139-1144.

21. Cintra, LT; Samuel, RO; Prieto, AKC; Sumida, DH; Dezan Júnior, E; Gomes Júnior, JE. Oral Health, diabetes, and body weight. *Arch Oral Biol* 2017; 73:94-99.

22. Colicet M, Gazivoda D, Vasilijic S, Vucevic D, Lukic A. Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. *J Oral Pathol Med*. 2010 Oct;39(9):690-6.

23. Cynthia AN. Drug Induced Nephrotoxicity. *AmFam Physician*. 2008;78(6):743-750.

24. Derakhshanfar A, Bidadkosh A, Kazeminia S. Vitamin E protection against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats: a biochemical and histopathologic study. *Iranian Journal Of Veterinary Research*. 2007; 8:231-238.

25. Eaton D, Pooler JP. *Fisiologia renal de Vander*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

26. E. Gkrania-Klotsas, Z. Ye, A.J. Cooper, et al. Differential white blood cell count and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of cross-sectional and prospective studies *PLoSOne*, p. e13405, May 2010.

27. Farombi EO, Ekor M. Curcumin attenuates gentamicin-induced renal oxidative damage in rats. *FoodChemToxicol*. 2006; 44(9):1443-8.

28. Gomes MS, Hugo FM, Hilgert JB, Sant'Ana Filho M, Padilha DMP, Simonsick EM. Apical periodontitis and incident cardiovascular events in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *IntEndod J.* - 2015
29. Gomes MS, Blattner TC, Sant'AnaFilho M, Grecca FS, Hugo FN, Fouad AF, Reynolds MA. Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? A systematic review and meta-analysis. *J Endod* 39:1205–1217. 2013
30. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol* 2011; 17:3.
31. Hosohata K. Role of Oxidative Stress in Drug-Induced Kidney Injury. *Int J Mol Sci.* 2016 Nov1;17(11). pii: E1826.
32. Kellum, J. A., Bellomo, R., & Ronco, C. (2008). Definition and Classification of Acute Kidney Injury. *NephronClinicalPractice*, 109(4), c182–c187.
33. López-López J, Jané-Salas E, Estrugo-Devesa A, Velasco-Ortega E, Martín-González J, Segura-Egea JJ. Periapical and endodontic status of type 2 diabetic patients in Catalonia, Spain: a cross-sectional study. *JEndod.* 2011 May;37(5):598-601.
34. Lukic A, Danilovic V, Petrovic R. Comparative immunohistochemical and quantitative analysis of inflammatory cells in symptomatic and asymptomatic chronic periapical lesions. *Vojnosanit Preg* 2008; 65: 435–40.
35. Markowitz GS, Perazella MA. Drug-induced renal failure: a focus on tubulointerstitial disease. *Clinica Chimica Acta.* 2005; 352:31-47.
36. Mehta RL, Pascua LMT, Sorokos S. Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: The PICARD experience. *The Kidney International.* 2004; 66:1613-21.
37. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15: 348-381.
38. Nunes TF, Brunetta DM, Leal CM, Pisi PCB, Roriz-Filho JS. Insuficiência renal aguda. *Medicina (Ribeirão Preto).* 2010; 43:272-82.

39. Odagiri K, Uehara A, Mizuta I, Yamamoto M, Kurata C. Longitudinal study on white blood cell count and the incidence of metabolic syndrome. *Intern Med.* 2011; 50(21):2491-8.
40. Pannu N, Nadim MK. An overview of drug-induced acute kidney injury. *Critical Care Medicine.* 2008; 36:216-223.
41. Rodríguez-Barbero A, AM Rodríguez-López, González- Sarmiento R, López-Novoa JM. Gentamicin activates cultured rats mesangial cells. A role for platelet activating factor. *Kidney Int.* 1995; 47-1346.
42. Samuel RO, Gomes-Filho JE, Azuma MM, Sumida DH, de Oliveira SHP, Chiba FY, Bomfim SRM, Ciarlini PC, Narciso LG, Cintra LTA. Endodontic infections increase leukocyte and lymphocyte levels in the blood. *Clin Oral Investig.* Apr 2017.22(3), 1395–1401. doi:10.1007/s00784-017-2222-z.
43. Schor N, I Ichikawa, HG Rennke, JL, Troy and BM Brenner. Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside treated rats. *Kidney Int.* 1981;19-288.
44. Tavafi M, Ahmadvand H. Effect of rosmarinic acid on inhibition of gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Tissue & Cell.* 2011; 43: 392-97.
45. Taylor, GW; Borgnakke, WS. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis.* 2008;14:191-203.
46. Valipour P, Heidarian E, Khoshdel A, Gholami-Arjenaki M. Protective Effects of Hydroalcoholic Extract of *ferulagoangulata* against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Iranian Journal of Kidney Diseases.* 2016; 10:189-96.
47. Xiong H, Wei L, Peng B. Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions. *J Endod.* 2009; 35:216-20.
48. Yamamoto T, Tsuneishi M, Furuta M, et al. Relationship between decrease of erythrocyte count and progression of periodontal disease in a rural Japanese population. *J Periodontol* 2011; 82:106–13.
49. Yarijani ZM, Najafi H, Madani SH. Protective effect of crocin on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2016; 19:337-343.
50. Zager RA. Pathogenetic mechanisms in nephrotoxic acute renal failure. *Semin Nephrol.* 1997;17(1):3-14.

51. Zager RA. Subclinical gentamicina nephrotoxicity: a potential risk fator for exaggerated endotoxin-driven TNF-alfa production. Am J Physiol Renal Physiol 2007; 293: F43-F49.

8 Anexos



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 **"Influência da insuficiência renal aguda no desenvolvimento e progressão da periodontite apical"**, Processo FOA nº 00373-2017, 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 17 de Maio de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 05 de Agosto de 2019.

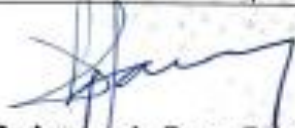
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 05 de Setembro de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Influence of acute kidney injury on the development and progression of apical periodontitis"**, Protocol FOA nº 00373-2017, under the supervision of Luciano Tavares Angelo Cintra presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 17, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 05, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 05, 2019.


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

