

Annelise Katrine Carrara Prieto

**Metabolismo oxidativo sérico em
ratos diabéticos com lesão periapical.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo
Cintra

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo César Ciarlini

2014

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P626m Prieto, Annelise Katrine Carrara.
Metabolismo oxidativo sérico em ratos diabéticos
com lesão periapical / Annelise Katrine Carrara Prieto. -
Araçatuba, 2014
98 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra
Coorientador: Prof. Paulo César Ciarlini

1. Diabetes Mellitus 2. Periodontite apical 3. Stress
oxidativo 4. Antioxidantes I. Título

Black D24
CDD 617.67

DADOS CURRICULARES

Annelise Katrine Carrara Prieto

Nascimento

22-09-1988

Diadema-SP

Filiação

Valentina Aparecida Carrara

Ramón Dario Prieto Benitez

2006/2011

Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

2012/2014

Curso de Mestrado em Ciência Odontológica, área de concentração em Endodontia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Associações

Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas

Associação Internacional de Pesquisas Odontológicas

Dedicat6ria

À minha mãe **Valentina**, que fez o poss6vel e o imposs6vel para me educar e n6o poupou esforç6s para me entender, apoiar e incentivar. Este momento n6o seria poss6vel sem o seu amor, dedicaç6o e esforç6. Estaremos sempre unidas pelo nosso amor, voc6 é o meu anjo da guarda, te amo!

À minha segunda mãe, minha av6 **Regina**, que sempre me incentivou. Meu exemplo de mulher forte, guerreira e objetiva. Obrigada por todo amor, atenç6o e cuidado que tem por mim. Te amo muito!

Aos meus tios **Valdir e Luis Carlos**, as duas pessoas mais esforçadas e respons6veis que conheço. Voc6s me inspiram! Este trabalho jamais se realizaria sem o apoio, carinho, incentivo e compreens6o de voc6s!

Amo-os!

Ao meu noivo, companheiro e amigo **Alstyn**, este trabalho n6o existiria sem o seu amor, paci6ncia e incentivo. Obrigada por me levantar cada vez que desanimava, e estar do meu lado em todos os momentos, te amo!

Dedico este trabalho a minha **fam6lia**, que é respons6vel por todos os meus passos, nada do que sou seria poss6vel sem voc6s. O meu amor, respeito e admiraç6o cresce a cada dia por cada um!

Agradecimentos especiais

Ao meu orientador, **Luciano Tavares Angelo Cintra**, pela paciência, dedicação e compromisso que teve comigo e com o nosso trabalho. Seus ensinamentos me deram base para a vida acadêmica. Admiro seu profissionalismo, competência, dedicação e persistência no seu exercício como professor de graduação, pós-graduação e pesquisador. Considero-me afortunada por ter estado sob sua orientação estes anos!

Ao meu co-orientador, **Paulo César Ciarlini**, pela colaboração imprescindível para a realização deste trabalho. Obrigada pela paciência, competência e dedicação!

À amiga de pós-graduação, **Mariane Maffei Azuma**, pelo auxílio, companheirismo, compromisso e dedicação que teve comigo e com o trabalho. Obrigada por fazer meu curso de mestrado inesquecível! Este trabalho não se realizaria sem a sua ajuda!

Ao professor, **Mauro Juvenal Nery**, pela amizade, incentivo e ajuda, desde a graduação. O Professor me introduziu à endodontia e fez a diferença no meu aprendizado. Você é Espetacular!

Ao pós-graduando em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, **Luis Gustavo Narciso**, pelo auxílio intensivo na realização deste trabalho. Obrigada pela paciência, disposição e compreensão!

Agradecimentos

A Deus, por ter permitido a realização deste sonho, me guiado em todos os momentos e colocado pessoas maravilhosas ao meu lado durante esta caminhada.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pela formação acadêmica e oportunidades de aprendizado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado.

À secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia, de Araçatuba pela orientação e suporte acadêmico.

Ao Professor de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **João Eduardo Gomes Filho**, pelos ensinamentos valiosos durante o curso de graduação e pós-graduação. Obrigada por todas as contribuições dadas ao trabalho!

Ao Professor de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **Eloi Dezan Júnior**, pela paciência, otimismo, perseverança e competência que sempre conduziu a clínica de Endodontia. Obrigada por todo o ensinamento e auxílio que me proporcionou!

Aos funcionários do departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **Nelci Vieira e Cláudia Neves**, pelo auxílio efetivo e indispensável ao trabalho. Pela amizade, apoio, paciência, compreensão e incentivo. Muito obrigada pelos ótimos momentos!

Aos funcionários do departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, **Peterson, Elaine e Grazielle**, pela ajuda, paciência, amizade e bons momentos compartilhados no laboratório de endodontia!

À pós-graduanda em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, **Jucilene Souza**, por todo o auxílio prestado ao trabalho.

Obrigada pela colaboração e paciência!

Ao médico veterinário, **Alstyn Momette**, pelo serviço prestado aos ratos do biotério de Endodontia, que compuseram o trabalho. Obrigada pelo auxílio e sugestões oferecidas!

À amiga, **Loiane Massunari**, pelo carinho, apoio, ajuda e incentivo que me deu durante todo o curso de mestrado. Obrigada pelo ombro amigo em todos os momentos que precisei, pelos conselhos, e os ótimos momentos e risadas compartilhadas. Ter te conhecido no mestrado fez diferença para mim!

Ao amigo, **Diego Valentim**, que sempre esteve disposto a me ajudar, ouvir e torcer por mim. Obrigada pelo incentivo, companheirismo, auxílio, conversas e pela amizade durante estes anos de pós-graduação!

Às amigas Lucianetes, **Luciana Ferreira Louzada, Renata Oliveira Samuel, Francine Benetti, Marcela Ito e Mariane Maffei Azuma**, muito obrigada pelos momentos, conversas, risadas e experiências compartilhadas! Vocês fizeram a alegria no meu mestrado, tenho orgulho de ter feito parte deste grupo de pesquisa tão unido, sério e competente! Orgulho em ser uma **Lucianete**! Obrigada a todas vocês pela ajuda, apoio e incentivo!

À amiga, **Índia Olinta Azevedo**, pelas conversas, franqueza, apoio e ajuda oferecida. Muito obrigada!

Aos amigos, **Paulo Duarte e Simone Wanatabe**, pela amizade, ajuda, apoio, bons momentos, e exemplo de profissionais dedicados e responsáveis.

Aos amigos de pós-graduação, **Ludmilla Santos, Christine Men Martins, Marcelo Wayama, Gabriely Rezende e Carlos Bueno**, pelo bom convívio e experiências compartilhadas.

À amiga, **Adilene Ângulo Gastélum**, pela amizade, apoio e incentivo. Amizade que surgiu graças à Endodontia e que continua mesmo com a distância México-Brasil. Muito obrigada pelos bons momentos!

As amigas, **Ana Paula Moreira e Vanessa Carvalho**, pela amizade, incentivo, apoio e ombro amigo. Porque as amizades verdadeiras continuam mesmo a distância!

À amiga, **Rita de Cássia Nunes**, pelas inúmeras vezes que me escutou, incentivou, ajudou, solucionou meus problemas e respondeu minhas dúvidas.

Muito obrigada por estar sempre perto quando precisei!

Ao amigo, **Rafael Astholfi**, pelo companheirismo, auxílio e bons momentos vividos na pós-graduação. Obrigada por tudo e por me apresentar meu grande amor!

"Lembremo-nos de que o homem interior se renova sempre. A luta enriquece-o de experiência, a dor aprimora-lhe as emoções e o sacrifício tempera-lhe o caráter. O Espírito encarnado sofre constantes transformações por fora, a fim de acrisolar-se e engrandecer-se por dentro".

Chico Xavier

PRIETO, AKC. Metabolismo oxidativo sérico em ratos diabéticos com lesão periapical. 2014. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da infecção endodôntica associada ou não à diabetes, nas concentrações séricas dos antioxidantes endógenos albumina, bilirrubina e ácido úrico, da capacidade antioxidante total (TAC) e do parâmetro oxidante malonaldeído (MDA) em soro sanguíneo de ratos Wistar. Foram utilizados 40 ratos divididos em 4 grupos: euglicêmicos (C); euglicêmicos com lesão periapical (LP); diabético (D) e diabético com lesão periapical (D+LP). A diabetes foi induzida quimicamente pela utilização da droga Aloxano, via intramuscular, na dose de 150 mg/kg, e a lesão periapical, por meio da exposição pulpar do primeiro molar superior direito ao meio bucal durante 30 dias. Após este período, foi coletado o sangue, através de punção cardíaca para obtenção do soro, e também, as hemimaxilas, para o processamento histológico. No soro foi realizada a mensuração da albumina pela técnica verde de bromocresol, bilirrubina por Van der Bergh, ácido úrico pela uricase, TAC pela captura do radical livre ABTS, e MDA pelo ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Na análise histológica foram avaliadas a intensidade e extensão da inflamação, reabsorção radicular e tamanho da lesão. Os valores foram analisados pelos testes de análise de variância (ANOVA) e de Tukey ($p < 0,05$). Os valores obtidos em escores foram analisados estatisticamente, por meio dos testes de Kruskal-Wallis e Dunn ($p < 0,05$). Nos ratos diabéticos (D e D+LP) houve um aumento da concentração de MDA e ácido úrico e uma diminuição de albumina em relação aos ratos euglicêmicos (C e LP). O grupo D+LP comparado ao D apresentou um aumento de ácido úrico e diminuição de albumina. A análise histológica mostrou que a lesão periapical de ratos diabéticos (D+LP) possui maior severidade quando comparada com a dos ratos euglicêmicos (LP). A lesão periapical associada com a diabetes altera o status antioxidante, diminuindo a concentração sérica de albumina e aumentando a de ácido úrico.

Palavras-chave: Diabetes. Lesão periapical. Estresse oxidativo.

PRIETO, AKC. Oxidative metabolism in blood serum of diabetic rats with or without periapical lesion. 2014. Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the influence of endodontic infection associated with or without diabetes, in the serum concentrations of endogenous antioxidants albumin, bilirubin and uric acid, total antioxidant capacity (TAC) and oxidant parameter, malondialdehyde (MDA) in blood serum of the Wistar. It were used 40 rats in 4 groups: euglycemic (E); euglycemic with periapical lesion (PL); diabetic (D) and diabetic with periapical lesion (D + PL). Diabetes was chemically induced by alloxan intramuscularly at a dose of 150 mg/kg and periapical lesion by exposure right first molar to the oral environment for 30 days. After this period, blood was collected via cardiac puncture to obtain serum, and also the hemi-jaws for histological processing. Albumin measurement by bromocresol green technique, bilirubin by Van der Bergh, uric acid by uricase, TAC by capturing the free radical ABTS, and MDA by assay of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were performed in serum. In the histological analysis, the intensity and extent of inflammation, root resorption and bone loss were evaluated. The values were analyzed by analysis of variance tests (ANOVA) and Tukey's test ($p < 0.05$). The values obtained for scores were statistically analyzed by the Kruskal- Wallis test and Dunn's tests ($p < 0.05$). In diabetic rats (D and D + PL) there was an increase in the concentration of MDA and uric acid while decrease in albumin compared to euglycemic rats (E and PL). D + PL group compared to D showed an increase of uric acid and decreased albumin. Histological analysis showed periapical lesion of diabetic rats (D + PL) has a greater severity when compared with the euglycemic rats (PL). Periapical lesion associated with diabetes changes the antioxidant status, reducing serum levels of albumin and increasing serum levels of uric acid.

Keywords: Diabetes. Periapical Lesion. Stress Oxidative.

Lista de tabelas

| | <i>Página</i> |
|--|---------------|
| Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais de acordo com os procedimentos locais e condições sistêmicas dos animais: | 42 |
| Tabela 2 - Média e desvio padrão da massa corporal inicial e final em mg/dl. | 50 |
| Tabela 3 - Média e desvio padrão da glicemia em mg/dl. | 50 |
| Tabela 4 - Média e desvio padrão da concentração sérica de albumina em mg/dl. | 51 |
| Tabela 5 - Média e desvio padrão da concentração sérica de ácido úrico em mg/dl. | 52 |
| Tabela 6 - Média e desvio padrão da concentração sérica de bilirrubina em mg/dl. | 53 |
| Tabela 7 - Média e desvio padrão da concentração sérica de TAC em mmol / L. | 54 |
| Tabela 8 - Média e desvio padrão da concentração sérica de MDA em $\mu\text{mol/L}$. | 55 |
| Tabela 9 - Representação dos scores atribuídos para os critérios de intensidade do infiltrado inflamatório e extensão da inflamação, reabsorção óssea e das médias de área da lesão periapical (μm^2). | 62 |

Lista de figuras

| | <i>Página</i> |
|---|---------------|
| Figura 1 - Injeção de aloxano via intramuscular em rato Wistar. | 41 |
| Figura 2 - (A) punção caudal para obtenção de sangue; (B) mensuração da glicemia; (C) resultado obtido da mensuração glicêmica . | 41 |
| Figura 3 - (A) exposição do primeiro molar superior direito por meio da broca Ln; (B) primeiro molar superior direito com exposição pulpar realizada. | 41 |
| Figura 4 -(A) punção cardíaca no ventrículo esquerdo; (B) armazenamento em tubos a vácuo para obtenção do soro. | 44 |
| Figura 5 - Espectrofotômetro automatizado. | 44 |
| Figura 6 - Representação gráfica da média e desvio padrão da concentração sérica de albumina em mg/dl. | 52 |
| Figura 7 - Representação gráfica da média e desvio padrão da concentração sérica de ácido úrico em mg/dl. | 53 |
| Figura 8 - Representação gráfica da média e desvio padrão da concentração sérica de bilirrubina em mg/dl. | 54 |
| Figura 9 - Representação gráfica da média e desvio padrão da concentração sérica de TAC em mmol/L. | 55 |
| Figura 10 - Representação gráfica da média e desvio padrão da concentração sérica de MDA em $\mu\text{mol/L}$. | 56 |
| Figura 11 - Imagens representativas de espécime do grupo E: (a, b) aspecto microscópico do periápice dentário evidenciando normalidade nos tecidos pulpares e periapicais [10x e 100x - H.E.]; (c) pré-dentina e dentina íntegras, camada de odontoblastos organizada [400x – H.E]; (d) ausência de inflamação [400x – H.E.]. | 58 |
| Figura 12 - Imagens representativas do grupo LP: (a) aspecto microscópico panorâmico do periápice dentário evidenciando presença de inflamação, desorganização do ligamento periodontal e área de reabsorção óssea [10x - H.E.]; (b) Periápice dentário evidenciando presença de infiltrado inflamatório crônico [100x - H.E.]; (c) presença de infiltrado inflamatório crônico e moderada área de reabsorção cementária [400x – H.E.]; (d) tecido pulpar necrosado [400x – H.E.]. | 59 |

Figura 13 - Imagens representativas do grupo D: (a, b) periápice dentário demonstrando tecidos pulpare e periodontais com aspectos de normalidade [10x e 100x - H.E.]; (c) polpa dentária demonstrando dentina, pré-dentina e odontoblastos com aspectos de normalidade [400x - H.E.]; (d) periápice com ausência de inflamação e integridade tecidual [400x - H.E.].

60

Figura 14 - Imagens representativas do grupo D+LP: (a, b) aspecto microscópico panorâmico do periápice dentário evidenciando presença de inflamação, desorganização do ligamento periodontal e área de reabsorção óssea [10x e 100x - H.E.]; (c) necrose do tecido pulpar e reabsorção cementária [400x - H.E.]; (d) infiltrado inflamatório agudo com grande concentração de neutrófilos [400x - H.E.].

61

Lista de abreviaturas

ABTS 2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

AGE produtos finais de glicação avançada

AGPI ácidos graxos poliinsaturados

ANOVA análise de variância

CAT catalase

DM diabetes mellitus

DNA ácido desoxirribonucleico

DP doença periodontal

DRC doença renal crônica

EDTA ácido etilenodiamino tetra-acético

eNOS óxido nítrico sintase endotelial

EO estresse oxidativo

FRAP ferric-reducing ability of plasma

GPx glutationala peroxidase

GSH glutationala reduzida

GSR glutationala

| | |
|--------------|--|
| GST | glutathiona transferase |
| LP | lesão periapical |
| LPO | lipoperoxidação |
| MDA | malonaldeído |
| MTA | mineral trióxido agregado |
| NADPH | nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida |
| NFκB | fator nuclear kappa B |
| NO | óxido nítrico |
| ORAC | oxygen-radical absorbancy capacity |
| PA | periodontite apical |
| PAI-1 | inibidor do ativador do plasminogênio - tipo 1 |
| PKC | proteína quinase C |
| RAGE | receptor de produtos finais de glicação avançada |
| RL | radical livre |
| ROS | espécies reativas ao oxigênio |
| SOD | superóxido dismutase |
| TAC | capacidade antioxidante total |
| TBARS | substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico |

| | |
|--------------------------------|---|
| TEAC | trolox equivalent antioxidante capacity |
| TGF-α | fator de transformação do crescimento - alfa |
| TGF-β1 | fator de transformação do crescimento - beta |
| TRAP | total radical trapping antioxidante parameter |
| VEFG | fator de crescimento do endotélio vascular |

Sumário

| | <i>Página</i> |
|--------------------------|---------------|
| I- Introdução | 20 |
| II-Revisão de literatura | 24 |
| III-Objetivos | 36 |
| IV-Material e Método | 38 |
| V-Resultados | 49 |
| VI-Discussão | 64 |
| VII-Conclusão | 70 |
| VIII-Referências | 72 |
| IX- Anexos | 92 |

Introdução

I- INTRODUÇÃO

Antioxidantes são substâncias capazes, em baixas concentrações, de competir com outros substratos oxidáveis e, portanto, atrasar significativamente ou inibir a oxidação (Halliwell & Gutteridge, 2007). Assim, os antioxidantes possibilitam ao organismo a manutenção de seu estado redox. O sistema de defesa antioxidante nos seres vivos pode atuar de três formas: como antioxidantes de prevenção, que impedem a formação de radicais livres; como varredores, impedindo o ataque de radicais livres às células; e de reparo, favorecendo a remoção de danos da molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) e a reconstituição das membranas celulares danificadas (Jacob, 1985; Strain & Benzie, 1998).

Os antioxidantes podem ser enzimáticos e não enzimáticos. Os enzimáticos correspondem a superóxido dismutase, catalase e peroxidase; os não enzimáticos endógenos compreendem bilirrubina, glutathione, ácido úrico e albumina, e os não enzimáticos adquiridos pela dieta são alfa tocoferol, beta caroteno, ácido ascórbico, carotenóides e bioflavonóides (Sies, 1985 ; Papas, 1999). Quando há uma deficiência destes antioxidantes ou um aumento na produção de radicais livres há um estado de estresse oxidativo.

O estresse oxidativo é relacionado com diversas patologias como hepatite B (Xia et al., 2013), diabetes tipo 1 (Răchișan et al., 2014), diabetes tipo 2 (Liani et al., 2012) doenças vasculares (Bachschmid et al., 2012), doenças pulmonares crônicas (Gorowiec et al., 2012), hipertensão (Pakdeechote et al., 2014) artrite reumatóide (Hassan et al., 2011), doença arterial coronária (Tayal et al., 2012), aterosclerose (Hulsmans et al., 2012), AIDS (Awodele et al., 2012), câncer (Valko et al., 2006), doença periodontal (Patel et al., 2012; Masi et al., 2011; Allen et al., 2011) e infecção endodôntica (Wolle et al., 2013).

O metabolismo oxidante do organismo é fundamental para a compreensão dos mecanismos envolvidos nos danos teciduais (Chapple et al., 2007) e contribui para terapias que visam mediar o estresse oxidativo (Kim et al., 2012; Stvolinsky et al., 2012; Gao et al., 2012) inclusive relacionada a lesões periapicais (Wolle et al., 2012; Wolle et al., 2013) e doença periodontal (Tilakaratne & Soory, 2012).

Como já mencionado, o estresse oxidativo está relacionado à diabetes, tanto tipo 1 quanto tipo 2, possuindo papel na sua patogênese (Maritim et al., 2003; West et al., 2000; Rahimi et al., 2005). A diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica

caracterizada por hiperglicemia devido aos defeitos na secreção de insulina, ou da ação da insulina, ou ainda ambos. A hiperglicemia crônica está associada a danos a longo prazo, disfunção, e falha de vários órgãos, principalmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. Segundo dados da Federação Internacional de Diabetes, em 2013, 382 milhões de pessoas no mundo tinham diabetes e este número deverá subir para 592 milhões até 2035. No Brasil 11,9 milhões de pessoas são portadoras (9% da população) da doença diabetes, ocupando o 4º lugar no ranking dos países com maior número de diabéticos (Guariguata et al., 2014).

Há estudos que mostram alta prevalência de infecção endodôntica em pacientes diabéticos descontrolados (Bender & Bender, 2003; Brito et al., 2003; Fouad & Burleson, 2003a; Fouad, 2003b; Iwana et al., 2003; Segura Egea et al., 2012). Uma das consequências da infecção endodôntica é o desenvolvimento de periodontite apical (PA) (Colic et al., 2010), que histologicamente, é caracterizada por um tecido granulomatoso infiltrado por células inflamatórias (Lukic et al., 2008), e é formada em resposta ao estímulo antigênico contínuo proveniente dos canais radiculares infectados (Zhang et al., 2005; Xiong et al., 2009).

Sabe-se que os pacientes diabéticos têm maior perda dentária decorrente do insucesso endodôntico (López-López et al., 2011; Wang et al., 2011; Ng et al., 2011), fato que indica a deficiente resposta do organismo diabético frente às infecções (Fouad & Burleson, 2003a), devido à alteração da circulação pulpar (Tennenberg et al., 1999), disfunção microbicida de polimorfonucleares (Bender & Bender, 2003) e aumento da carga bacteriana (Iwana et al., 2006). No entanto, evidências que suportam a patogênese, progressão e resolução das infecções endodônticas em pacientes com DM são ainda escassas e inconclusivas (Ferreira et al., 2014). Alguns trabalhos relacionam a lesão periapical com o metabolismo oxidativo, mostrando aumento de parâmetros oxidantes e diminuição de antioxidantes (Cherkashin et al., 1989; Dezerega et al., 2012).

Dentre os parâmetros antioxidantes podemos destacar a capacidade antioxidante total (TAC), que é uma visão geral das interações entre os antioxidantes, (Maxwell et al., 2006), e não apenas a soma das capacidades antioxidantes de cada componente, já que eles interagem entre si, apresentando efeitos sinérgicos ou inibitórios (Kuskoski et al., 2005).

A avaliação de TAC inclui a mensuração de antioxidantes não enzimáticos, tanto de natureza lipofílica como hidrofílica (Kuskoski et al., 2005), tais como albumina, GSH, ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, ácido úrico, bilirrubina, e flavonoides (Prior & Cao, 1999). Há estudos que relacionaram TAC com as infecções bucais, particularmente a doença periodontal, processos cariosos e dor temporomandibular (Akalin et al., 2009; Žilinskas et al., 2011; Kumar et al., 2011). A avaliação isolada de antioxidantes endógenos, tais como albumina, bilirrubina e ácido úrico também se mostra uma alternativa confiável para se estabelecer parâmetros que influenciam no desequilíbrio fisiológico tecidual (Kim et al., 2012).

Além do estudo de TAC e dos antioxidantes endógenos de forma isolada, a avaliação de parâmetros oxidantes complementa o entendimento do estresse oxidativo tecidual. A lipoperoxidação lipídica (LPO) é uma das principais consequências do estresse oxidativo e um indicador indireto da ação dos radicais livres (Halliwell et al., 1990). Uma das técnicas mais utilizadas para mensurar a LPO é a mensuração de malonaldeído (MDA), que é um dialdeído formado como produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados.

Investigações sobre oxidantes e antioxidantes em modelos experimentais com lesão pulpar são escassos na literatura e não existem estudos que associam a lesão periapical de origem endodôntica à diabetes com enfoque na avaliação do estresse oxidativo. Com isso, buscou-se investigar a influência da infecção endodôntica e consequente lesão periapical associada à diabetes no metabolismo oxidativo sérico.

Revisão de Literatura

II- REVISÃO DE LITERATURA

I- Estresse oxidativo, diabetes e complicações.

O termo estresse oxidativo (EO) foi cunhado em 1985 por Helmut Sies e desde então diversos estudos foram realizados buscando esclarecer seu papel nos processos fisiológicos e patológicos. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre as concentrações de radicais livres (RLs) e antioxidantes, o que leva a uma alteração fisiológica tecidual (Halliwell & Gutteridge, 2007).

O oxigênio desempenha um papel duplo na célula: é essencial para organismos aeróbios, mas também pode gerar RLs (Gaté et al., 1999). RL é um átomo ou molécula que possui número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, o que o deixa altamente reativo (Halliwell & Gutteridge, 1990; Halliwell, 1992). Eles são formados constantemente em consequência do metabolismo fisiológico ou das alterações patológicas e, quando produzidos em exagero, são nocivos e alteram a estrutura molecular de carboidratos, proteínas, lipídeos e DNA, trazendo prejuízo a essas moléculas essenciais (Halliwell & Gutteridge, 2007). Os RLs oriundos do oxigênio são chamados de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Os RLs são gerados a partir do oxigênio tripleto, o qual respiramos, que é reduzido e forma uma nova espécie, o ânion superóxido. Este processo é mediado por enzimas como NADPH oxidase, xantina oxidase e glucose oxidase como também por componente redox reativo como a semi-ubiquinona e a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (Deby & Goutier, 1990; Fridovich, 1978). Quando protonado o ânion superóxido é denominado radical hidroperoxila, e possui facilidade em iniciar destruição de membranas biológicas (Halliwell & Gutteridge, 1990). O radical superóxido também pode ser transformado em peróxido de hidrogênio, por meio da enzima superóxido dismutase (SOD) (Chance et al., 1979). Este radical é um metabólito do oxigênio de vida longa, que consegue atravessar camadas lipídicas e reagir com o Fe^{++} aumentando sua toxicidade (Scott et al., 1991). O peróxido de hidrogênio na presença de metais de transição como o íon ferroso converte-se em radical hidroxila (Chance et al., 1979), este RL possui alta reatividade no seu próprio sítio de produção, portanto, se produzido próximo ao DNA e este fixado a um metal, poderá causar modificações de bases purínicas e pirimidínicas, que levam à inativação ou mutação do

DNA. O radical hidroxila também atua na inativação de várias proteínas, oxidando grupos sulfidrilas a pontes dissulfeto, e iniciando assim a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (Halliwell & Gutteridge, 1986).

Os RLs existem em células e tecidos biológicos em baixas concentrações (Halliwell & Gutteridge, 2007) que são determinadas pelo equilíbrio entre as suas taxas de produção e depuração ou por meio de antioxidantes (Droge, 2002). Eles estão envolvidos na patogênese de várias doenças, incluindo a diabetes, que é causada pela destruição autoimune das células- β pancreáticas com consequente deficiência de insulina, ou anormalidades que resultam na resistência à ação da insulina. Deficiência de ação e secreção existe no mesmo paciente frequentemente, e nem sempre é claro qual anormalidade, sozinha, é a principal causa da hiperglicemia. A deficiência da ação da insulina nos tecidos alvo resulta em anormalidades no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (American Diabetes Association, 2014).

Na diabetes há um aumento na produção de RLs (Baynes, 1999; Young, 1995) ou deficiência nas defesas antioxidantes (McLennan et al., 1991), e o EO é apontado como participante nas complicações diabéticas (Ceriello, 2000; Baynes, 1991).

A hiperglicemia é o fator causador do aumento do EO em diabéticos, ela causa um excesso na produção do radical superóxido na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Nishikawa et al., 2000; Browlee, 2005;) que em consequência ativa cinco vias, a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), o aumento da expressão do receptor de AGEs, o RAGE, o aumento do fluxo da via dos polióis, ativação da proteína kinase C (PKC), e a hiperatividade da via hexosamina, todas envolvidas nas complicações diabéticas (Browlee, 2005; Giacco & Brownlee, 2010).

Os AGEs, ligações entre carboidratos e proteínas, podem ocorrer formando bases de Schiff, as quais dão origem a produtos Amadori, este é um processo reversível que depende das concentrações da glicemia. No entanto, quando ocorrem modificações em sua estrutura, por meio de reações de desidratação e oxidação, estes produtos se tornam mais reativos, e com a capacidade de realizar ligações irreversíveis com as proteínas, causando alteração da funcionalidade proteica (Sakurai e Tsuchiya, 1988; Rocha et al., 2006; Goldim et al., 2006). A formação dos AGEs, não realiza apenas a glicação e fragmentação de proteínas, eles também estão envolvidos no processo de

auto-oxidação da glicose que geram por sua vez mais ROS (Hunt et al., 1990, Zyzak et al., 1995).

Outro fator que induz as complicações diabéticas é a ligação dos AGEs aos seus receptores RAGEs, que existem em macrófagos, células endoteliais vasculares e células de músculo liso vascular, esta ligação provoca a produção de ROS, que por sua vez ativa o fator de transcrição pleiotrópico, fator nuclear kappa B (NFkB), causando várias alterações patológicas na expressão genética (Goldin et al., 2006).

O fluxo aumentando da via dos polióis causado pela hiperglicemia aumenta a atividade das enzimas aldose redutase e sorbitol desidrogenase, estas provocam acúmulo intracelular de sorbitol e frutose, que provoca um aumento redox devido ao consumo NADPH, que é um cofator necessário para regenerar a glutatona reduzida (GSH), que por sua vez é um importante limpador de RLs, induzido, portanto, o EO intracelular (Giacco & Browlee, 2010).

A proteína C quinase (PKC), é um sinalizador intracelular envolvidos na regulação de muitas funções vasculares. Quando ativada pela glicose, a PKC ativa NAD(P)H oxidases, levando ao aumento na formação de RLs (Inoguchi et al., 2003), induzindo a expressão do fator VEGF (Williams et al., 1997), diminuindo a produção de óxido nítrico (NO) (Ganz & Seftel, 2000) e inibindo a expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Kuboki et al., 2000).

E por último a hiperglicemia também é capaz de aumentar a via hexosamina, na qual a frutose-6-fosfato é desviada da glicólise servindo de substrato para a enzima glutamina, este processo esta envolvido no aumento da transcrição de TGF- α (fator de transformação do crescimento - alfa), TGF- β 1 (fator de transformação do crescimento - beta) e PAI-1 (inibidor do ativador do plasminogênio - tipo 1) (Sayeski & Kudlow, 1996; Kolm-Litty et al., 1998; Giacco & Browlee, 2010).

Os mecanismos resultantes da hiperglicemia e do conseqüente aumento de ROS (espécies reativas de oxigênio) estão envolvidos na patogenia da micro e da macroangiopatia diabética. Na microangiopatia, como consequência direta da hiperglicemia intracelular, e na macroangiopatia, decorrente do aumento no fluxo de ácidos graxos (Giacco & Browlee, 2010). A macroangiopatia está associada ao infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e gangrena de membros inferiores (Monteiro et

al., 2007), e a microangiopatia nos processos patológicos como retinopatia, nefropatia e neuropatia diabética, pois nestes tecidos há independência de insulina para a captação de glicose (Browlee, 2005).

II- Diabetes e infecções endodônticas

A hiperglicemia causa glicação não enzimática de proteínas, e a persistência da hiperglicemia acaba levando a formação de AGEs, onde as ligações com proteínas são irreversíveis. Portanto, quando a glicose se liga a proteínas de longa vida como albumina e colágeno, estes compostos se depositam na membrana basal causando espessamento de capilares, que leva a microangiopatia (Vlassara & Palace, 2002; 2003; Basta et al., 2004), os capilares diabéticos possuem uma tendência à agregação plaquetária gerando a lentificação do fluxo sanguíneo capilar (Huntley, 1995).

As alterações microvasculares são observadas na polpa dental diabética, que conduz a uma diminuição no fluxo sanguíneo pulpar (Amatyakal et al., 2006) promovendo uma menor oxigenação do tecido pulpar (Leite et al., 2008), supressão microbicida de neutrófilos, dificuldades do sistema de defesa humoral e celular de comparecer ao local da injúria, e aumento da probabilidade de infecções anaeróbias (Bender & Bender, 2003), conduzindo a necrose pulpar (Catanzaro et al., 2006). Em consequência a contínua agressão que a polpa sofre em decorrência da hiperglicemia, ocorre um contínuo quadro de inflamação, confirmado pela presença de componentes inflamatórios, como calicreína e mieloperoxidase (Catanzaro et al., 2006), e também a ocorrência de estresse oxidativo, indicado pelas alterações dos parâmetros oxidantes e antioxidantes (Leite et al., 2008). Outra característica da polpa diabética é sua matriz extracelular alterada devido à diminuição de colágeno, presença de AGEs e aumento da colagenase (Catanzaro et al., 2006), conduzindo a alterações de sua arquitetura celular.

É bem elucidado que a polpa dentária, na presença de hiperglicemia é incapaz de desempenhar sua capacidade de defesa. Portanto, agentes infecciosos, traumas, ou até mesmo procedimentos curativos e estéticos, como capeamento pulpar, restauração de cavidades profundas e clareamento, não conseguem provocar na polpa uma resposta protetora eficiente (Leite et al., 2008). No estudo de Garber et al., 2009, a polpa dental

de rato foi incapaz de promover a formação de ponte de dentina em decorrência do capeamento pulpar com MTA, mostrando sua dificuldade em reparação.

Estudos mostram que a diabetes é capaz de aumentar a progressão e severidade de lesões periapicais (Kohsaka et al., 1996; Foaud et al., 2002; Iwama et al., 2003; Armada- Dias, 2006; Kodama et al., 2011; Nakahara et al., 2012), permitir o aumento bacteriano intracanal e, diminuir a quimiotaxia (Iwama et al., 2006) em modelos animais, e que esse quadro pode ser melhorado pelo controle glicêmico (Nakahara et al., 2013).

Não é apenas a polpa dental que está mais frágil na condição diabética, o estudo de Yeh et al., 2012 mostra que a hiperglicemia em combinação com redução salivar, leva a diminuição de proteínas de mineralização e matriz do esmalte, deixando o dente um alvo mais susceptível a penetração bacteriana. As lesões periapicais são consequências tanto do aumento da susceptibilidade à cárie (Kodama et al., 2011; Nakahara et al., 2012; Yeh et al., 2012), como também, da via de anacorese (Bender & Bender, 2003).

Estudos clínicos e epidemiológicos reforçam a influência da diabetes nas infecções endodônticas, já que, em pacientes diabéticos existe uma maior prevalência de periodontite apical, tratamento endodôntico, probabilidade de casos assintomáticos, risco de extração após o tratamento endodôntico, pior prognóstico para dentes obturados e maior probabilidade de envolvimento periodontal (Brito et al., 2003; Fouad & Burleson, 2003; Wang et al., 2011; López-López et al., 2011; Marotta et al., 2012; Ferreira et al., 2014). Outra particularidade clínica é a frequência com que pacientes diabéticos apresentam calcificações pulpares (Bender & Bender, 2003), fato que pode ser explicado pelo aumento da expressão de osteopontina em pacientes diabéticos (Inagaki et al., 2010).

Devido à potencialização que a diabetes causa nos processos infecciosos, enfatiza-se a necessidade de pesquisar a microbiologia e as reações imunoinflamatórias envolvidas nas infecções endodônticas diabéticas, que poderá levar a investigações de terapias eficazes focadas no tratamento endodôntico (Foaud, 2003b; Lima et al., 2013).

As modificações que a diabetes realiza tanto na polpa dentária como nos processos infecciosos que originam a lesão periapical está claramente confirmada pela

literatura, cabendo mais investigações a respeito da fisiopatologia dos fatores que conduzem essas modificações. Por outro lado, a influência que o processo infeccioso endodôntico exerce no organismo diabético, possui muitas lacunas. Existem estudos que apontam a influência da infecção local na condição sistêmica diabetes, piorando o quadro do controle glicêmico, por meio do aumento da hemoglobina glicada (Cintra et al., 2014a), aumentando a carga inflamatória, elevando as concentrações séricas de IL-17 (Cintra et al., 2014b), interferindo no perfil lipídico, aumentando o triglicérides (Cintra et al., 2013a), alterando o hemograma (Cintra et al., 2014c) e indicando uma influencia na disfunção renal, por meio do aumento de creatinina (Cintra et al., 2013b). O estudo de Astolpho et al., 2013 relata que a lesão periapical em ratos normais, é capaz de provocar alterações no sinal e na sensibilidade de insulina. E estudos que relacionam terapias sistêmicas no intuito de amenizar as lesões periapicais (Wolle et al., 2013; Liu et al., 2012).

III- Estresse oxidativo e alterações pulpares e periapicais

Os primeiros trabalhos a relacionar o metabolismo oxidativo e endodontia foram o de Niamonitos et al., 1985 e Cherkashin et al., 1989. O primeiro, inserindo uma experimentação com um antioxidante endógeno (vitamina E) com o fim de propiciar o reparo da lesão periapical, o qual obteve bons resultados. E o segundo, mensurando produtos de peroxidação lipídica no sangue de pacientes portadores de granuloma apical, encontrando alterações destes produtos. Desde então, outros trabalhos relacionaram os parâmetros antioxidantes e oxidantes com as alterações pulpares.

Estudos em polpas inflamadas humanas mostram que há um aumento da enzima antioxidante catalase, SOD, e dos produtos finais de peroxidação lipídica, MDA (Ge et al., 1996. Esposito et al., 2003), indicando que a polpa possui mecanismo de defesa endógeno contra a toxicidade das espécies reativas de oxigênio. A análise específica de parâmetros do metabolismo oxidativo na presença da diabetes se limita ao estudo de Leite et al., 2008 que encontrou uma maior concentração de catalase em polpas de ratos diabéticos. O estudo na LP indica que há um aumento de oxidante total no próprio tecido da LP, enquanto que, o fluido gengival do dente portador de periodontite apical assintomática mostrou uma diminuição de TAC em relação ao controle e aos dentes com canal tratado (Dezerega et al., 2012). A prevenção dos danos oxidativos ao tecido

pulpar e periapical por meio de antioxidantes é alvo de recentes pesquisas, e tem apresentado bons resultados. E o caso do antioxidante tempol, que administrado via oral, foi capaz de amenizar o estabelecimento de LP em ratos com cardiomiopatia, (Wolle et al., 2012). No entanto, o mesmo antioxidante tempol administrado em ratos diabéticos induzidos experimentalmente não foi eficiente para diminuir a extensão das LP (Wolle et al., 2013). Já o antioxidante astaxantina testado via oral em ratos diabéticos foi capaz de estimular glutathione peroxidase, mas não apresentou efeitos em SOD (Leite et al., 2010a). Em cultura de células pulpares submetidas ao estresse oxidativo por glicose, o antioxidante davalliactone foi capaz de reduzir a produção de H₂O₂, a toxicidade celular e as moléculas inflamatórias que perturbam as células da polpa (Lee et al., 2013). A associação astaxantina, óleo de peixe administrados via oral diminuíram os substratos oxidativos em polpa de ratos normais, por meio da redução das enzimas SOD e glutathione reductase (GSR) (Leite et al., 2012).

O efeito tópico de antioxidantes também foi analisado, por meio do estudo da catalase como agente capeador direto em dentes de cães com exposições classe V, mostrando que aos sete dias não houve diferença no reparo, porém, aos 90 dias houve um maior reparo observado histologicamente em relação ao controle não tratado (Alaçam et al., 2000). E também, por meio do estudo da enzima antioxidante SOD no tratamento de canal de molares de ratos portadores de lesão induzida, os resultados mostraram que a SOD pode controlar a inflamação periapical e induzir a proliferação de dentina e cimento, indicando que a SOD pode ser um material biocompatível ideal para o tratamento de canal (Baumgarder &Sulfaro, 2001).

IV- Parâmetros antioxidantes

Antioxidantes protegem o organismo contra a ação oxidativa dos RLs, pois em baixas concentrações conseguem atrasar ou inibir a oxidação do substrato, podendo ser encontrados no organismo e nos alimentos (Dias et al., 2010).

Existem os antioxidantes que possuem atividade enzimática, que são os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação removendo os RLs, e os não enzimático que interagem com os RLs e são consumidos durante a reação. As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase

(CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GSR) e glutathione transferase (GST). Dentre as principais defesas antioxidantes não enzimáticas estão as vitaminas C e E, carotenóides, flavonóides, bilirrubina, ácido úrico, albumina, e glutathione (GSH), todos sendo captadores de radicais. As defesas antioxidantes podem ser produzidas endogenamente ou adquiridas pela dieta (Kaliora et al., 2006; Cotinguiba et al., 2013).

A albumina é a proteína mais abundante no sistema circulatório e possui funções benéficas como: regulação da pressão oncótica e uma grande capacidade de ligação e transporte de metabólitos (Scatchard et al., 1945). No sistema circulatório atua como o principal antioxidante presente, sendo constantemente sujeita ao estresse oxidativo (Halliwell, 1988). Ela atua por meio de seus vários sítios de ligações retendo os RLs, porém, quando submetida ao processo de glicação ocorre deficiência em suas propriedades antioxidantes, o que é devido ao fato de que é modificada estruturalmente e funcionalmente (Chesne et al., 2006; Rondeau et al., 2008). A albumina também é uma alternativa como marcador glicêmico de períodos curtos (2 a 4 semanas) (Yoshiuchi, 2008), e um importante marcador de lesão renal, seja uma lesão renal primária ou em consequências a doenças sistêmicas como hipertensão e diabetes.

Outro antioxidante endógeno é a bilirrubina, que é originada do catabolismo do grupo heme da hemoglobina (Roy-Chowdhury et al., 2008; Ryter., 2012). A enzima heme oxigenase quebra o tetrapirrol cíclico em biliverdina, monóxido de carbono e ferro ferroso, por sua vez, a biliverdina é transformada em bilirrubina por meio da ação da enzima biliverdina reductase (Hayashi et al., 2004). A bilirrubina era considerada pela medicina apenas como produto residual do metabolismo da hemoglobina (Vitekand & Ostrow, 2009), no entanto, se mostrou com propriedades antioxidantes em modelos experimentais sendo considerado, um potente catalizador de oxigênio (Stocker et al., 1987b), e redutor do estresse oxidativo global (Fuhua et al., 2012). Estudos relatam que a concentração de bilirrubina é inversamente associada com o risco de aterosclerose periférica (Vitek e Schwertner, 2007; Schwertner & Vitek, 2008; Vitek & Ostrow, 2009; Lin et al., 2010), calcificação arterial coronária (Tanaka et al., 2009), e acidente vascular cerebral isquêmico (Kim et al., 2009). Estes estudos indicam que, baixas concentrações de bilirrubina sérica estão associadas a um maior risco dessas condições patológicas; em quanto que, concentrações ligeiramente elevadas de bilirrubina fornecem proteção.

O terceiro antioxidante endógeno a ser estudado é o ácido úrico, um ácido orgânico fraco, produto final de degradação dos nucleotídeos de purina (George & Struthers, 2009) e catalisado pela enzima hepática xantina oxireductase (Schulz et al., 2011), sendo molécula antioxidante mais abundante no sangue (Spanou et al., 2012), e fornecendo até 60% da capacidade antioxidante no sangue humano (Parmar, 2008). Este antioxidante possui propriedades quelantes de metal, sendo capaz de realizar a limpeza de radicais superóxido, hidroxilas, e oxigênio singlet, bem como bloquear a formação do forte oxidante peroxinitrito (Johnson et al., 2003; Keizman et al., 2009). O ácido úrico é capaz de atuar como protetor no processo de envelhecimento e em doenças neurológicas (Johnson et al., 2009; Scott & Hooper, 2001) e ao mesmo tempo estar associado a desordens cardiovasculares (Lippi et al., 2008; Edwards, 2008, 2009; Holme et al., 2009.), hipertensão, doença progressiva renal (Verdecchia et al., 2000; Johnson et al., 2003; Men & Punzo, 2008), acidente vascular cerebral (Kin et al., 2009); diabetes mellitus tipo 2, (Dehghan et al., 2008), resistência a insulina e síndrome metabólica (Puig & MartÃnez, 2008; Oda et al., 2009), o que faz deste antioxidante um paradoxo (Sautin & Jonhson, 2008).

V- Mensuração da capacidade antioxidante total

Ao contrário da análise isolada de cada antioxidante, a mensuração da capacidade antioxidante total apresenta a acumulação e interação que existe entre eles no plasma ou soro, formando um parâmetro que é capaz de revelar o equilíbrio redox existente *in vivo*.

Existem na literatura muitos testes utilizados para mensurar a capacidade antioxidante total, e eles variam quanto ao tipo de radicais gerados, indicador de oxidação, e método usado para detecção e quantificação. São os chamados ensaios de captação, em todos eles um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de ressonância do spin eletrônico. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite sua análise quantitativa. Dentre os testes utilizados, existe o Total Radical - Trapping Antioxidant Parameter – TRAP, Oxygen-Radical Absorbancy Capacity - ORAC, Ferric-Reducing Ability of Plasma - FRAP, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity ou Teste

do ABTS – TEAC (Halliwell & Gutteridge, 2007). TRAP e ORAC são métodos que envolvem reações de transferência de átomos de hidrogênio e FRAP e TEAC, transferência de elétrons (Huang et al., 2005).

O TEAC baseia-se na inibição do cátion radical 2,2', azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}), por antioxidantes. No método original há ativação de metamioglobina como peroxidase, em presença de ABTS. O complexo perferril da hemeproteína produziria o cátion radical ABTS^{•+} de cor azul esverdeada. A adição desse radical a um meio contendo antioxidantes consegue avaliar por meio do grau de descoloração, a capacidade antioxidante do mesmo. Alguns autores sugerem o uso de oxidação química de ABTS, com utilização de reagentes como dióxido de manganês ou persulfato de potássio, uma vez que outros antioxidantes podem contribuir para reduzir o radical ferrimioglobina formado durante a reação. O percentual de inibição de ABTS^{•+} é determinado em função da concentração e do tempo. Quando a medida é relativa à reatividade do trolox, como padrão, sob as mesmas condições, o teste é denominado TEAC, expresso como unidades equivalentes de trolox que correspondem a mmol/L. Este método é aplicável para o estudo de antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis (Re et al., 1999).

Além da análise dos antioxidantes, a mensuração de parâmetros oxidantes também proporciona o entendimento do quadro do estresse oxidativo tecidual. Quando há produção excessiva de RLs a capacidade de ação dos antioxidantes é superada e ocorre oxidação de biomoléculas, como lipídeos, proteínas e DNA (Halliwell & Whiteman, 2004). A oxidação lipídica leva a lipoperoxidação (LPO) da membrana celular, que origina lesões celulares, já que ocorrem alterações na estrutura da membrana levando a destruição de sua estrutura, prejuízo dos mecanismos de trocas metabólicas e morte celular (Benzie, 1996).

VI- Lipoperoxidação

A LPO pode ser dividida em três etapas, iniciação, propagação e terminação. Na fase de iniciação ocorre a interação de ROS com os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), abstraindo o hidrogênio de um grupamento metil, deixando o carbono deste

grupamento instável, o qual se estabiliza por um rearranjo molecular formando dieno conjugado, que se combina com oxigênio formando o radical peroxil, o qual é capaz de interagir com outra molécula lipídica abstraindo hidrogênio, e assim dá início a propagação da LPO, uma fase de reação em cadeia. É necessário ressaltar que na fase de propagação há formação de dienos conjugados e hidroperóxidos, que são marcadores primários de LPO, eles resultam da combinação dos radical peroxil com os hidrogênios abstraídos. A última fase da LPO é a terminação que se dá pela aniquilação dos radicais, que reagem entre si formando moléculas estáveis, nesta fase também ocorre clivagem, dismutação e rearranjo dos radicais peroxila que geram produtos secundários da LPO, como o MDA, que são utilizados como marcadores secundários da LPO (Halliwell & Gutteridge, 2007).

O MDA é um dialdeído formado pela clivagem beta dos AGPI peroxidados durante a LP, a sua determinação é umas das técnicas de avaliação de oxidação lipídica mais frequentemente utilizada. Em meio ácido e aquecido o MDA reage com compostos nucleofílicos como ácido tiobarbitúrico, produzindo cromógenos que podem ser determinados por absorção no visível ou fluorescência (Benzie, 1996; Lima & Abdalla, 2001).

Objetivos

III- OBJETIVOS

Objetivo geral:

Verificar a inter-relação entre LP e diabetes por meio de parâmetros do metabolismo oxidativo.

Objetivos específicos

- estabelecer a influência da infecção endodôntica, associada ou não a diabetes, nos antioxidantes endógenos albumina, bilirrubina e ácido úrico;
- avaliar a influência da infecção endodôntica na capacidade antioxidante total sérica em ratos euglicêmicos e diabéticos;
- verificar a inter-relação da infecção endodôntica com o estresse oxidativo sérico por meio da quantificação do MDA em ratos com e sem diabetes; e
- realizar análise microscópica do tecido pulpar e periapical de ratos euglicêmicos e diabéticos.

Material e Métodos

IV- MATERIAL E MÉTODOS

1- Material

1.1-Animais

Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 250g, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Na chegada dos animais ao biotério de Endodontia, os ratos foram submetidos a um protocolo de vermifugação com uma solução de ivermectina 1% (Ivomec – Merial - Paulínia- São Paulo- Brasil), em uma dose de 0,3ml diluídos em 1L de água, a qual foi exposta aos animais durante três dias, e ao término, se esperou sete dias da metabolização da droga, para iniciar os experimentos. Os animais foram mantidos em gaiolas com mini-isolador (Série VentiLife, Alesco – Monte Mor, Brasil) que injeta o ar diretamente no mini-isolador, com fluxo contínuo e de baixa velocidade, o que garante uma troca de ar ideal e equilíbrio da pressão interna. Cada gaiola abrigava 4 animais, e todas elas estavam acopladas no rack ventilado (Série VentiLife, Alesco – Monte Mor, Brasil), foi utilizada maravalha estéril em todas as gaiolas, durante todo o período experimental. Os animais foram alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água filtrada “ad libitum”. Os procedimentos experimentais propostos neste estudo foram aprovados pelo comitê de conduta ética no uso de animais em experimentação (CEUA –Unesp / 00582-2012) (anexo 1).

1.2-Doses empregadas

Para anestesia foi empregado via intramuscular uma associação de um sedativo à base de xilazina a 2% (Rompum-Bayer S. A., São Paulo, SP, Brasil) na dosagem de 10 mg por kilograma de peso corporal e um anestésico à base de Cloridrato de Ketamina a 10% (Francotar- Virbac do Brasil Ind. e Com. Ltda., Roseira, SP, Brasil) na dosagem de 80 mg por kilograma de peso corporal.

Para a indução da diabetes foi utilizado via intramuscular uma dose de 150mg/kg de aloxano (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA), dissolvida em tampão citrato (0.01M; pH 4,5).

2-Métodos

2.1-Indução da diabetes

Metade dos animais (20 ratos) receberam uma dose de 150mg/kg de aloxano dissolvida em tampão citrato (0.01M; pH 4,5), via intramuscular (Figura 1). A outra metade recebeu solução salina como placebo. No sexto dia após a indução, foi realizada a dosagem de glicose sanguínea para confirmação da hiperglicemia, a qual foi realizada por meio de uma punção com agulha hipodérmica 27G 13 X 0,4 mm (Nipro Corporation, Honjo-Nishi, Kita-ku, Osaka, Japan) na extremidade da cauda do animal seguida por uma compressão para obtenção de uma gota de sangue. Na sequência, utilizando o aparelho para glicemia e às fitas glicotestes (Accu-Check Performa-Roche-Diagnostics Corporation Indianapolis, IN, USA) os valores foram obtidos e foram selecionados os ratos que obtiveram resultados acima de 250 mg/dl para compor o lote de animais diabéticos (figura 2). Outros animais foram adicionados ao estudo até o total de 20 ratos diabéticos.

2.2-Indução da infecção endodôntica

Após a confirmação da hiperglicemia, 10 ratos euglicêmicos e 10 ratos diabéticos foram anestesiados. Realizou-se a exposição pulpar do primeiro molar superior direito de cada animal, empregando-se uma broca em aço carbono esférica (Broca Ln Long Neck- Maillefer, Dentsply Ind. E Com. Ltda. Petrópolis, RJ, Brazil) com 0,1mm de diâmetro na ponta. Desta forma, todas as exposições pulpares foram padronizadas em diâmetro. A profundidade foi limitada pela espessura do teto da câmara pulpar, até o rompimento do mesmo (sensação de caída) (figura 3).

2.3-Divisão em grupos

Os grupos foram formados de acordo com as condições sistêmicas e os procedimentos locais de indução das lesões periapicais podem ser visualizados na tabela 1.

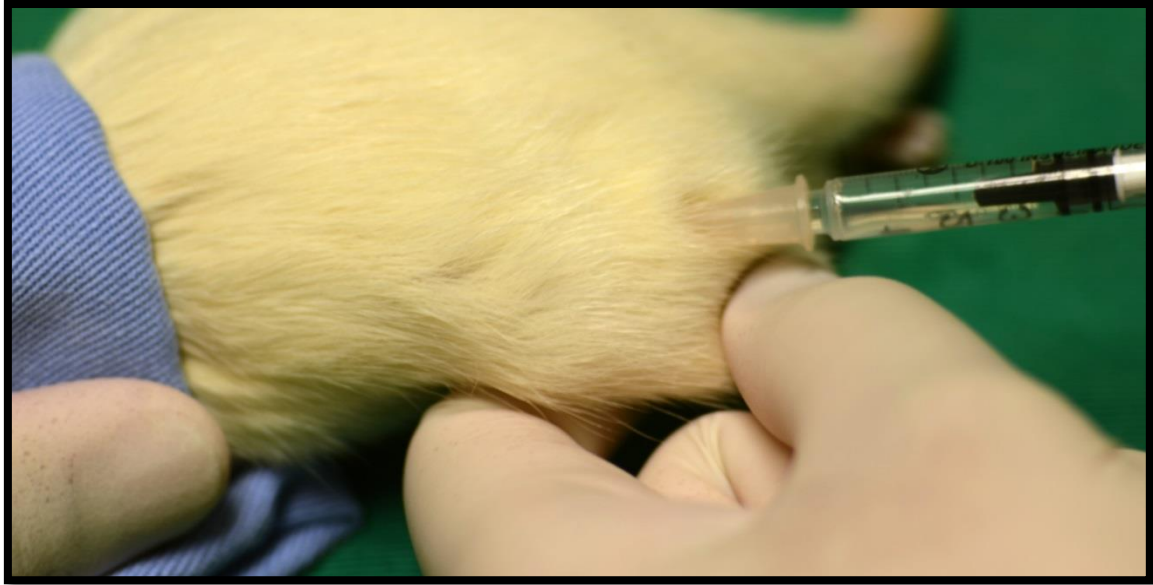


Figura 1. Injeção da droga aloxano via intramuscular, em rato Wistar.

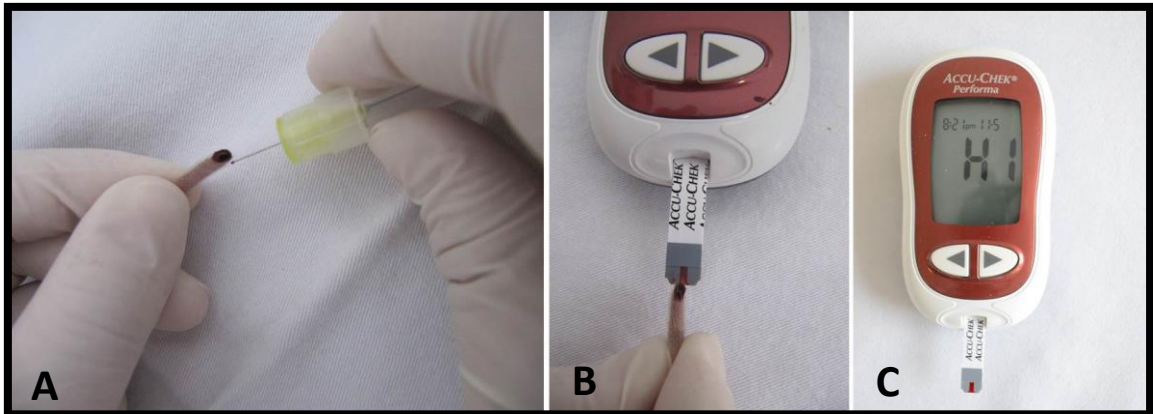


Figura 2. (A) punção caudal para obtenção de sangue; (B) mensuração da glicemia; (C) resultado obtido da mensuração glicêmica.

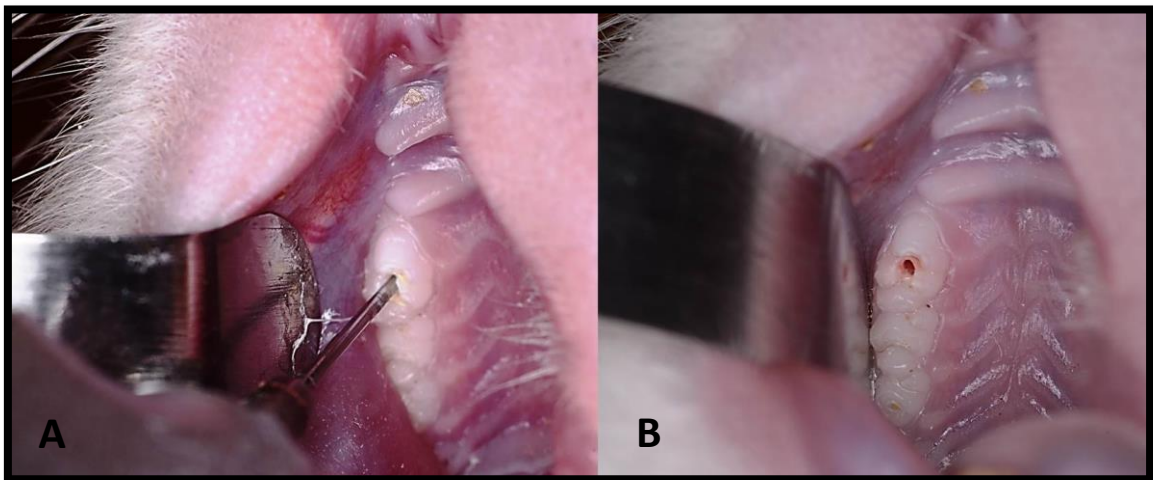


Figura 3. (A) exposição do primeiro molar superior direito por meio da broca Ln; (B) primeiro molar superior direito com exposição pulpar realizada.

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais de acordo com os procedimentos locais e condições sistêmicas dos animais.

| | | Condição local | |
|---------------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | Sem lesão pulpar | Com Lesão Pulpar |
| Condição sistêmica | Normal | E | LP |
| | Diabético | D | D+LP |

Os 40 ratos em estudo foram divididos em 4 grupos experimentais, contendo 10 animais cada:

- Grupo Controle (E): ratos euglicêmicos;
- Grupo com lesão pulpar (LP): ratos euglicêmicos e portadores de infecção endodôntica induzida;
- Grupo diabético (D): ratos hiperglicêmicos;
- Grupo diabético com lesão pulpar: (D+LP): ratos hiperglicêmicos e portadores de infecção endodôntica induzida.

2.4-Sacrifício dos animais e coleta das amostras

a-Obtenção do tecido sanguíneo

Decorridos os 30 dias pós-operatórios, os ratos foram anestesiados conforme protocolo descrito anteriormente. Foi realizada a coleta de 5 ml de sangue de cada animal, por meio de punção cardíaca com agulha 22G 25 X 0,7 mm (Figura 4). O sangue coletado foi armazenado em tubos a vácuo jateado com gel ativador de coágulo em suas paredes (vacuotainer BD) e permaneceu em repouso por 20 minutos para ser centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro. Após a coleta sanguínea, os animais foram mortos com sobredose anestésica seguida de deslocamento cervical.

b- Obtenção das maxilas

Após confirmação de morte dos animais, removeu-se toda a pele da face direita e esquerda do animal com dois cortes com tesoura (S.S.White / Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), situados no ângulo da boca, separando a mandíbula e maxila. Empregando

uma lâmina intercambiável nº15 (Becton, Dickinson Ind. Cir. Ltda. Curitiba, PR, Brasil), montada em cabo de bisturi (S.S.White / Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), foi realizada uma incisão em profundidade no palato do animal ao nível de plano sagital mediano acompanhando a sutura intermaxilar separando a maxila direita da esquerda. Separadas as maxilas, foi realizado outro corte com tesoura tangenciando a face distal dos molares superiores direitos, possibilitando a obtenção da hemimaxila direita. Em seguida, as hemimaxilas foram colocadas em frascos individuais devidamente identificados, contendo solução formalina tamponada (10%) em pH neutro. Após 48 horas as peças foram lavadas em água corrente por um período de 5 horas para a remoção de toda solução de fixação. Após lavagem, as peças foram desmineralizadas em solução de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 18%. Na sequência, as hemimaxilas 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 elemento dentário e estruturas de suporte em seu sentido longitudinal. Uma vez incluídas as peças foram cortadas em micrótomo Leica RM 2045 (Leica Microsystems, Nussloch – Germany), e os cortes com 6 µm de espessura foram selecionados de forma semi-seriada. Foram escolhidos os cortes teciduais que evidenciaram a câmara pulpar, o trajeto do canal principal e a lesão periapical. Para cada espécime, 10 lâminas com 3 cortes teciduais cada, foram preparadas e coradas com Hematoxilina e Eosina.

2.5-Forma de análise dos resultados

2.5.1-Determinação dos antioxidantes endógenos e da capacidade antioxidante total.

As análises bioquímicas séricas foram realizadas, conforme orientações dos fabricantes, em espectrofotômetro automatizado (BS-200 Chemistry Analyzer. Mindray. High-tech Industrial Park, Nanshan. China) (figura 5) a 37°C, previamente ajustado com calibrador e soros controles nível I e II comerciais (Biosystems, Barcelona, Spain).



Figura 4. (A) punção cardíaca no ventrículo esquerdo de rato Wistar; (B) armazenamento em tubos à vácuo para obtenção do soro.



Figura 5: Espectrofotômetro automatizado.

2.5.1a - Antioxidantes endógenos

Todos os antioxidantes endógenos, albumina, bilirrubina e ácido úrico tiveram sua concentração determinada por meio de kits comerciais (BIOSYSTEMS S. A - Barcelona – Espanha). Os protocolos de mensuração dos antioxidantes endógenos foram determinados conforme a orientação do fabricante. A albumina foi mensurada pelo método verde de bromocresol, o ácido úrico pelo método uricase e a bilirrubina pelo método sulfanilico diazotado (anexo 2).

2.5.1b- Determinação da capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total foi determinada por método colorimétrico que se baseia na captura da molécula $ABTS^+$ (2,2 'azinobis 3 etilbenzotiazolina-6-sulfonato). O antioxidante presente na amostra reage com o $ABTS^+$ (azul esverdeado) levando este a seu estado reduzido (ABTS) e incolor (EREL, 2004) (anexo 3).

2.5.2- Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica sérica foi determinada pela quantificação de MDA pelo método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) pelo método de Hunter modificado, com auxílio de uma leitora automática de microplacas de 96 poços e absorvância 545 nm (anexo 4).

2.8-Análise microscópica

A análise microscópica foi realizada em todos os grupos (E, LP, D e D+LP) de forma descritiva e quantitativa em cortes teciduais representativos de cada grupo. A análise quantitativa foi realizada em função das variáveis: infiltrado inflamatório quanto à sua intensidade e extensão; presença de reabsorções radiculares e perda de estrutura óssea periapical. Foram atribuídos escores de 1 a 4 para os critérios intensidade e extensão do infiltrado inflamatório e para a presença de reabsorções radiculares. Para a

mensuração da área da lesão periapical, se empregou programa de imagens específico (Leica QWin Plus - Leica Microsystems, Nussloch –Germany).

Os critérios considerados para cada análise segundo cada escore foram:

a – 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 (Holland et al., 2007) (Quadro 1).

Quadro 1 – 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) |

b – Extensão do infiltrado inflamatório

A extensão do infiltrado inflamatório foi estabelecida após uma verificação prévia de todos os espécimes. Após esta primeira análise a máxima magnitude da inflamação foi considerada e os critérios estabelecidos para o período de análise (Quadro 2).

Quadro 2 – Escores para o critério extensão do infiltrado inflamatório junto ao tecido periapical

| | |
|----------|---|
| Escore 1 | Células inflamatórias ausentes ou em número desprezível; |
| Escore 2 | Células inflamatórias ocupando extensão de até 300µm do ápice radicular; |
| Escore 3 | Células inflamatórias ocupando extensão de até 600µm do ápice radicular; |
| Escore 4 | Células inflamatórias ocupando extensão maior que 600µm do ápice radicular. |

c – Presença de reabsorções radiculares

A presença de reabsorções radiculares foi analisada em conformidade com o número médio de lacunas de reabsorção presentes em diferentes campos, de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400x junto ao periápice dentário (Quadro 3).

Quadro 3 – Escores para o critério presença de reabsorções radiculares

| | |
|----------|--|
| Escore 1 | Ausência de lacunas de reabsorção; |
| Escore 2 | Presença discreta de lacunas de reabsorção cementária (menos de 3 lacunas por campo); |
| Escore 3 | Presença moderada de lacunas de reabsorção cementária e reabsorção dentinária ao acaso (mais de 3 e menos de 6 lacunas por campo); |
| Escore 4 | Presença intensa de lacunas de reabsorção cementária e reabsorção dentinária (mais que 6 lacunas por campo). |

d – Área da lesão periapical

Foram selecionados cortes representativos de cada espécime dos grupos com doença pulpar com e sem diabetes (Grupos LP e D+LP) para verificar a área da lesão periapical proveniente da infecção endodôntica. Foi empregado o software Leica QWin Plus (Leica Microsystems, Nussloch – Germany) e os valores foram expressos em micrometro quadrado (μm^2) obtidos em medidas de área.

2.6 – Análise estatística

Análises séricas: Por se tratar de valores absolutos os dados foram tabulados e expostos por meio das médias observadas em cada grupo, em função do período experimental. Foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas, o teste de Tukey.

Análise histológica: Para os dados na forma de escores foram aplicados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis (Siegel et al., 1956) e quando observada alguma diferença significativa, realizou-se o cruzamento entre os grupos, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn (Dunn, 1958). Foi empregado o teste de Mann Whitney (Siegel et al., 1956) para comparação entre dois grupos isoladamente. Por se tratar de avaliação por meio de escores, os dados foram expostos nas tabelas referentes

aos testes estatísticos por meio de postos médios. Para os valores absolutos da mensuração da lesão periapical, coletados por meio da análise histométrica, foi realizada a análise da variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey para comparação entre as médias. Por se tratar de avaliação métrica os dados foram expostos por meio das médias dos valores observados em cada grupo, em função dos períodos de observação.

Para todos os testes empregados (bioquímicos e histológicos) foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Todos os valores expressos na forma de escores ou por medidas foram analisados com o Software Pacote (Microsoft Visual FoxPro, Direitos: Eymar Sampaio Lopes).

Resultados

III -RESULTADOS

1- Massa corporal e glicemia

Realizou-se a mensuração da massa corporal inicial (dia 0) e a final (dia 36). Ao início do experimento, os ratos apresentavam massa corporal média de 260g. Após a indução da diabetes com aloxano, os ratos dos grupos diabéticos (D e D+LP) perderam massa corporal em comparação aos euglicêmicos ($p=0,0001$) (tabela 2).

A mensuração da glicose sanguínea foi realizada nos dias 0, 6 e 36 (tabela 3). A mensuração no dia 0, momento da indução da diabetes, revelou que todos os ratos estavam euglicêmicos ao início do experimento. No dia 6 (indução da infecção endodôntica) verificou-se a eficácia da droga em induzir diabetes, os grupos D e D+LP apresentaram um aumento significativo da glicemia ($p = 0,0001$). No último dia experimental (dia 36) houve a confirmação de que os ratos dos grupos diabéticos (D e D+LP) permaneciam hiperglicêmicos.

Tabela 2 – Média e desvio padrão da massa corporal inicial e final em mg/dl.

| Grupos | Dia 0 | Dia 36 | N |
|--------|--------------------------|--------------------------|----|
| E | 269,8±20,65 ^a | 410±31,08 ^a | 10 |
| LP | 268,1±23,57 ^a | 381,1±31,50 ^a | 10 |
| D | 273,5±11,72 ^a | 210±38,33 ^b | 10 |
| D+LP | 260±24,16 ^a | 211,4±30,51 ^b | 10 |

Letras iguais sobrescritas na mesma coluna indicam ausência de diferença estatística ($p>0,05$). Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna (a,b) indicam diferença estatística ($p<0,05$).

Tabela 3 – Média e desvio padrão da glicemia em mg/dl.

| Grupos | Dia 0 | Dia 6 | Dia 36 | N |
|--------|-------------------------|--------------------------|------------------------|----|
| E | 73,7±9,80 ^a | 79,8±11,06 ^a | 95±7,33 ^a | 10 |
| LP | 79,8±9,14 ^a | 82,8±8,97 ^a | 89±8,78 ^a | 10 |
| D | 73,5±12,29 ^a | 597,3±6,26 ^b | 586±20,96 ^b | 10 |
| D+LP | 74,4±7,86 ^a | 555,4±51,88 ^c | 600±0,00 ^b | 10 |

Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna (a,b,c) indicam diferença estatística ($p<0,05$).

2- Análise Bioquímica

Os parâmetros antioxidantes (albumina, ácido úrico, bilirrubina e capacidade antioxidante total) e o oxidante (MDA) foram mensurados e suas medias expressas em tabelas e gráficos.

Albumina

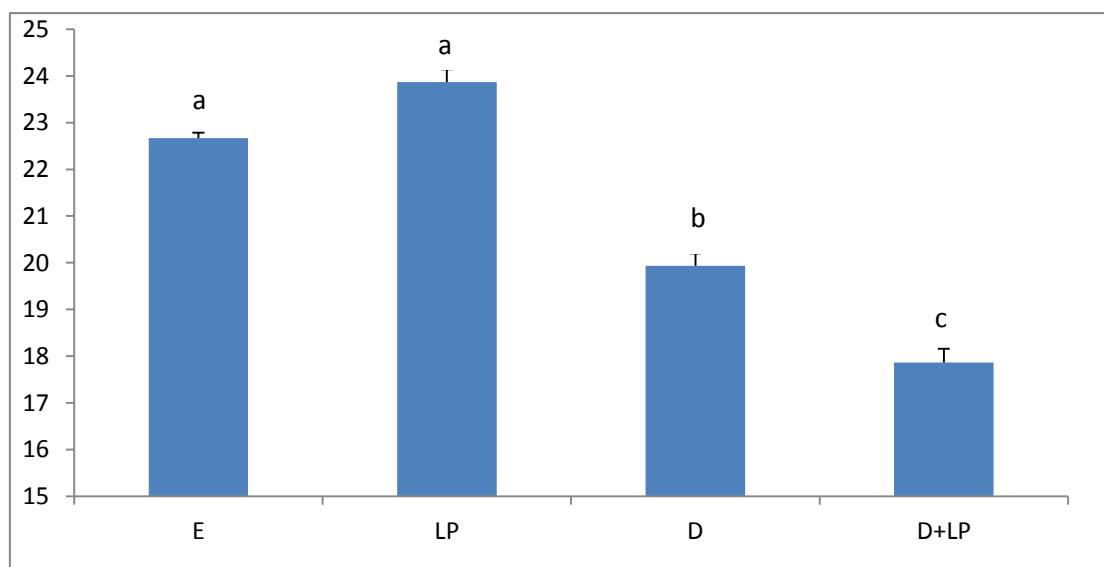
A concentração sérica de albumina encontrada aos 30 dias após a indução da lesão periapical nos grupos estudados está expressa na tabela 4. Observou-se comparando os grupos diabéticos (D, D+LP) com os euglicêmicos (E, LP) um decréscimo na concentração de albumina ($p=0,0001$). Indicando que a diabetes foi determinante para essa diminuição. Também foi evidenciado na presença de lesão periapical uma diminuição da albumina nos grupos diabéticos com diferença estatística significativa, utilizando teste T de Student na comparação dois a dois ($p=0,0475$).

Tabela 4 – Média e desvio padrão da concentração sérica de albumina em mg/dl.

| Grupos | Albumina (mg/dl) | n |
|--------|-------------------------|----|
| E | 22,67±2,22 ^a | 10 |
| LP | 23,87±1,79 ^a | 10 |
| D | 19,93±2,62 ^b | 10 |
| D+LP | 17,86±2,05 ^c | 10 |

Letras sobrescritas diferentes (a,b,c) em colunas representam diferença estatística ($p<0,05$).

Figura 6 – Representação gráfica da média e desvio padrão da concentração sérica de albumina em mg/dl.



Letras diferentes (a,b,c) representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Ácido Úrico

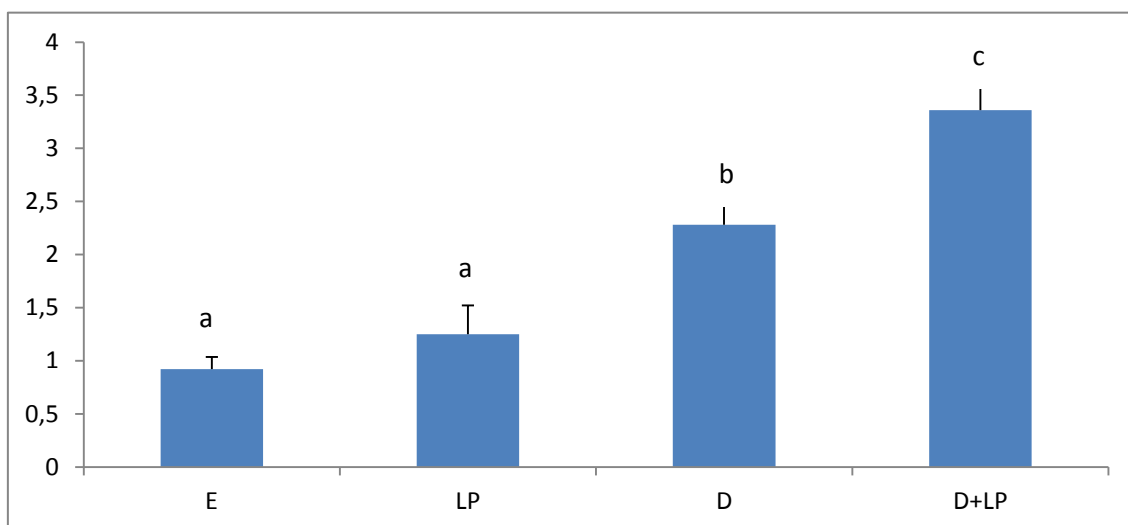
A concentração sérica de ácido úrico nos grupos estudados (tabela 5) apresentou um aumento nos grupos diabéticos (D e D+LP) em relação aos euglicêmicos (E e LP) e entre os grupos diabéticos, o grupo D+LP apresentou maior concentração de ácido úrico comparado ao grupo D ($p = 0,0001$).

Tabela 5 – Média e desvio padrão da concentração sérica de ácido úrico em mg/dl.

| Grupos | Ácido Úrico (mg/dl) | N |
|--------|---------------------|----|
| E | $0,92 \pm 0,37^a$ | 10 |
| LP | $1,25 \pm 0,86^a$ | 10 |
| D | $2,28 \pm 0,85^b$ | 10 |
| D+LP | $3,36 \pm 0,94^c$ | 10 |

Letras sobrescritas diferentes (a,b,c) em colunas representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Figura 7– Representação gráfica da média e desvio padrão da concentração sérica de ácido úrico em mg/dl.



Letras diferentes (a,b,c) representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Bilirrubina

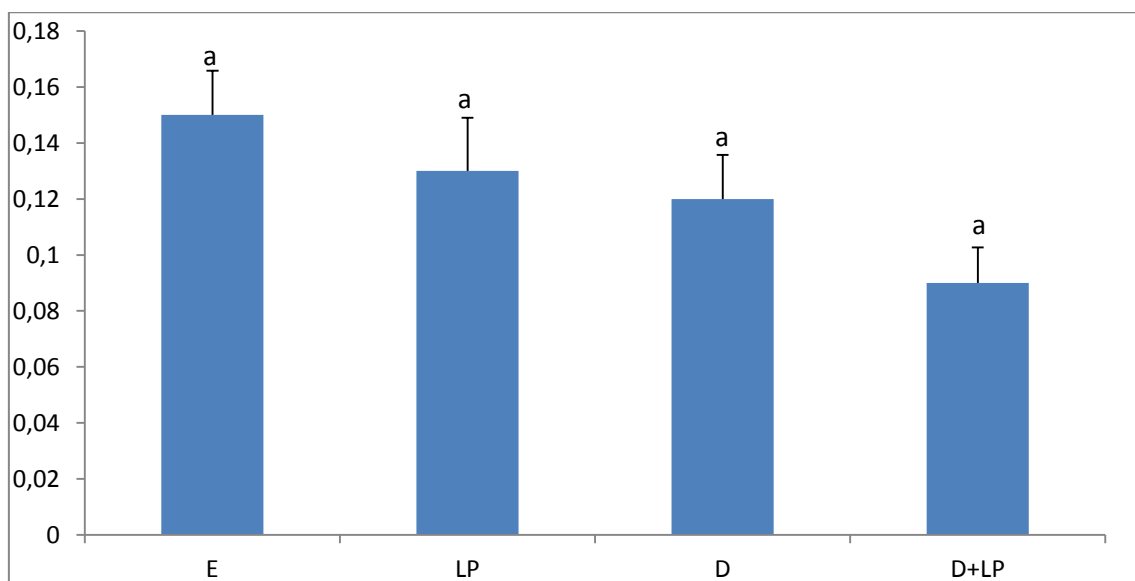
A concentração sérica de bilirrubina não apresentou diferença estatística entre os grupos estudados ($p = 0,0955$) (tabela 6).

Tabela 6– Média e desvio padrão da concentração sérica de bilirrubina em mg/dl.

| Grupos | Bilirrubina (mg/dl) | n |
|--------|------------------------|----|
| E | 0,15±0,05 ^a | 10 |
| LP | 0,13±0,06 ^a | 10 |
| D | 0,12±0,05 ^a | 10 |
| D+LP | 0,09±0,04 ^a | 10 |

Letras sobrescritas iguais (a) em colunas representam ausência diferença estatística ($p < 0,05$).

Figura 8 – Representação gráfica da média e desvio padrão da concentração sérica de bilirrubina em mg/dl.



Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$).

Capacidade Antioxidante Total

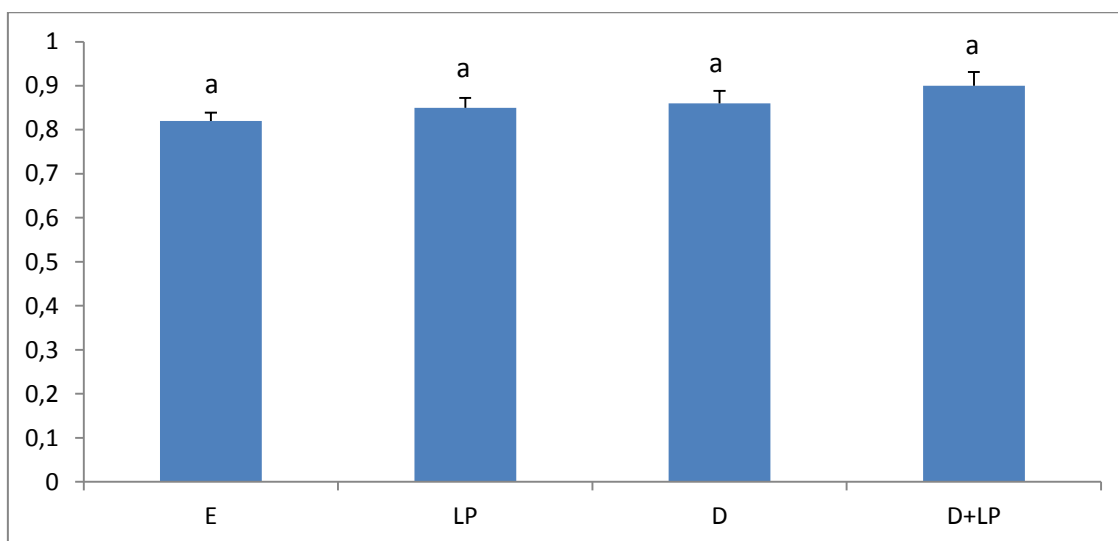
Na tabela 7, observamos que assim como as concentrações de bilirrubina, a capacidade antioxidante total não apresentou diferença estatística entre os grupos estudados ($p = 0,0610$).

Tabela 7 – Média e desvio padrão da concentração sérica de TAC em mmol/L.

| Grupos | TAC (mmol/L) | N |
|--------|------------------------|----|
| E | 0,82±0,06 ^a | 10 |
| LP | 0,86±0,07 ^a | 10 |
| D | 0,87±0,09 ^a | 10 |
| D+LP | 0,95±0,10 ^a | 10 |

Letras sobrescritas iguais em colunas representam ausência diferença estatística ($p > 0,05$).

Figura 9 – Representação gráfica da média e desvio padrão da concentração sérica de TAC em mmol/L.



Letras iguais indicam ausência diferença estatística ($p > 0,05$).

Malonaldeído

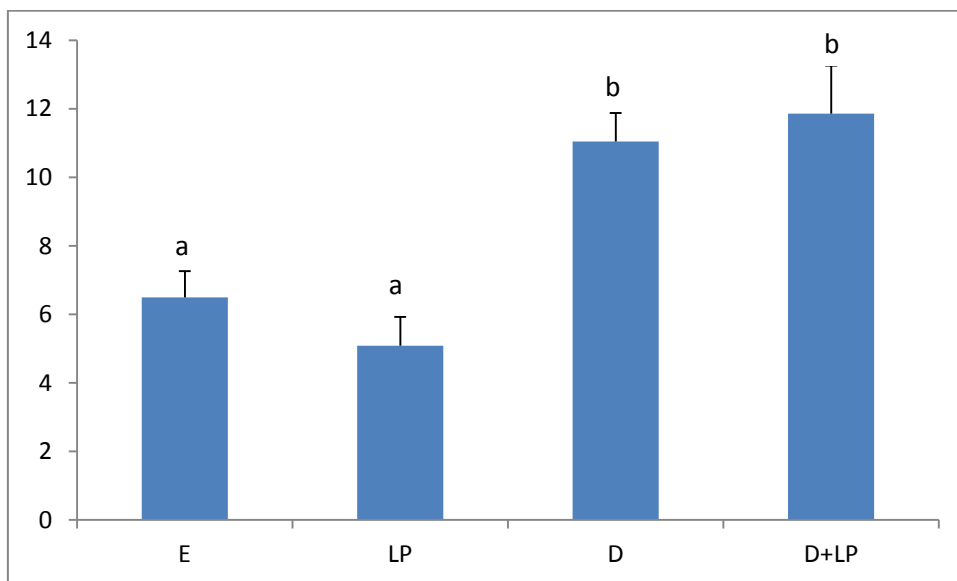
O MDA atua como um marcador de estresse oxidativo. Nos grupos estudados sua concentração sérica teve um aumento na presença da diabetes (grupos D e D+LP) comparado com os grupos euglicêmicos (E e LP) ($p = 0,0001$) (tabela 8).

Tabela 8 – Média e desvio padrão da concentração sérica de MDA em $\mu\text{mol/L}$.

| Grupos | MDA ($\mu\text{mol/l}$) | N |
|--------|-------------------------------|----|
| E | 6,49 \pm 2,45 ^a | 10 |
| LP | 5,08 \pm 2,67 ^a | 10 |
| D | 11,04 \pm 2,64 ^b | 10 |
| D+LP | 11,86 \pm 4,34 ^b | 10 |

Letras sobrescritas diferentes (a,b) em colunas representam diferença estatística ($p < 0,05$)

Figura 10 – Representação gráfica da média e desvio padrão da concentração sérica de MDA em $\mu\text{mol/L}$.



Letras diferentes (a,b) representam diferença estatística ($p < 0,05$).

3-Análise Microscópica

Grupo euglicêmico (E)

Observou-se tecido pulpar com aspectos de normalidade denotando homeostasia deste tecido. As estruturas pré-dentinária e dentinária apresentaram-se íntegras e dispostas em continuidade com a camada de odontoblastos, também organizada. 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 cimento, ligamento e osso alveolar apresentaram-se íntegros e isentos de processo inflamatório ou reabsorção. A inserção conjuntiva e o epitélio juncional demonstraram aspectos de normalidade e integridade tecidual. Este grupo serviu de parâmetro para a análise dos demais (figura 11) (tabela 9).

Grupo com lesão periapical (LP)

Pôde-se observar em todos os espécimes analisados presença de tecido necrosado em toda a cavidade pulpar e inflamação no periápice dentário. Observou-se a predominância de infiltrado inflamatório do tipo crônico. Presença de reabsorção cementária, dentinária e óssea. A região do ligamento periodontal, junto ao vértice apical, apresentou-se desorganizada, com presença de tecido necrosado e inflamação subjacente. Todas as lesões encontradas foram de características compatíveis com granuloma periapical com origem devido à necrose pulpar (figura 12) (tabela 9).

Grupo de ratos diabéticos (D)

De forma semelhante ao grupo euglicêmico, foi observado tecido pulpar com aspecto de normalidade. A estrutura dentinária e a pré-dentina apresentaram-se íntegras, assim como a camada de odontoblastos. Poucas células inflamatórias estavam presentes e dispersas na polpa dentária denotando ausência de inflamação. Os vasos sanguíneos apresentaram-se congestionados e a densidade celular e fibrosamento caracterizaram polpa jovem com potencial de reparo. O grupo D serviu como um segundo controle, a fim de se estabelecer parâmetros para a análise. O que os diferencia é o quadro da diabetes presente no grupo D. Analisando-os comparativamente percebe-se que a diabetes não alterou a integridade do endodonto no período analisado (figura 13) (tabela 9)

Grupo de ratos diabéticos com lesão periapical (D+LP)

De forma semelhante ao grupo euglicêmico com lesão pulpar, observou-se em todos os espécimes, tecido necrosado em toda a cavidade pulpar. Junto ao periápice evidenciou-se a predominância de infiltrado inflamatório do tipo agudo, presença de microabscessos e intensa concentração de neutrófilos. Observou-se a presença de reabsorção cementária e dentinária na superfície apical e em regiões de ramificações radiculares. Junto ao tecido ósseo foram encontradas lacunas de reabsorção ativa em toda a periferia do granuloma. A região do ligamento periodontal apresentou-se desorganizada com presença de tecido necrosado e inflamação subjacente. Assim como observado no grupo LP, todas as lesões encontradas foram de características compatíveis com granuloma periapical (figura 14) (tabela 9).

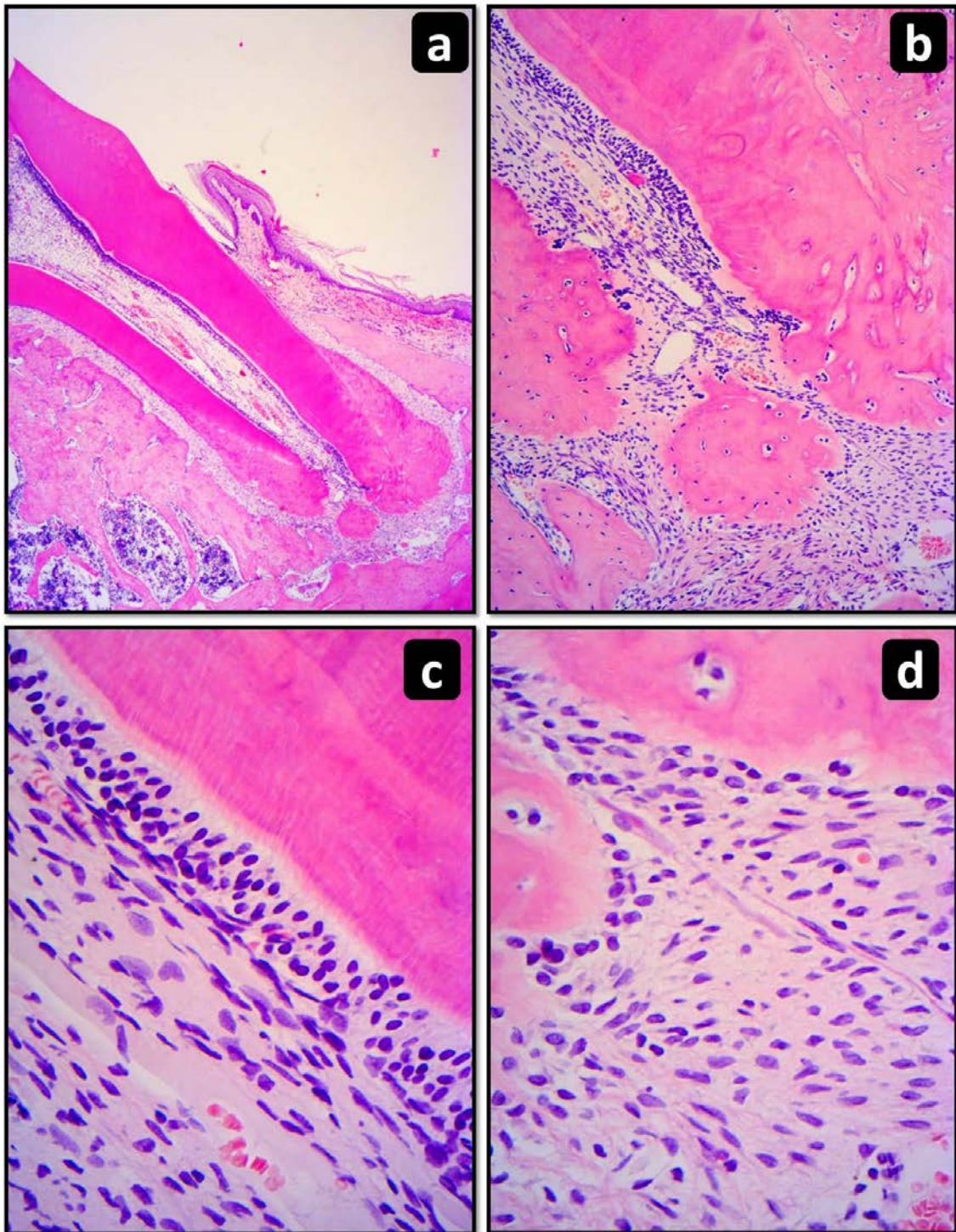


Figura 11 - Imagens representativas de espécime do grupo E: (a, b) aspecto microscópico do periápice dentário evidenciando normalidade nos tecidos pulpare e periapicais [10x e 100x - H.E.]; (c) pré-dentina e dentina íntegras, camada de odontoblastos organizada [400x - H.E.]; (d) ausência de inflamação [400x - H.E.].

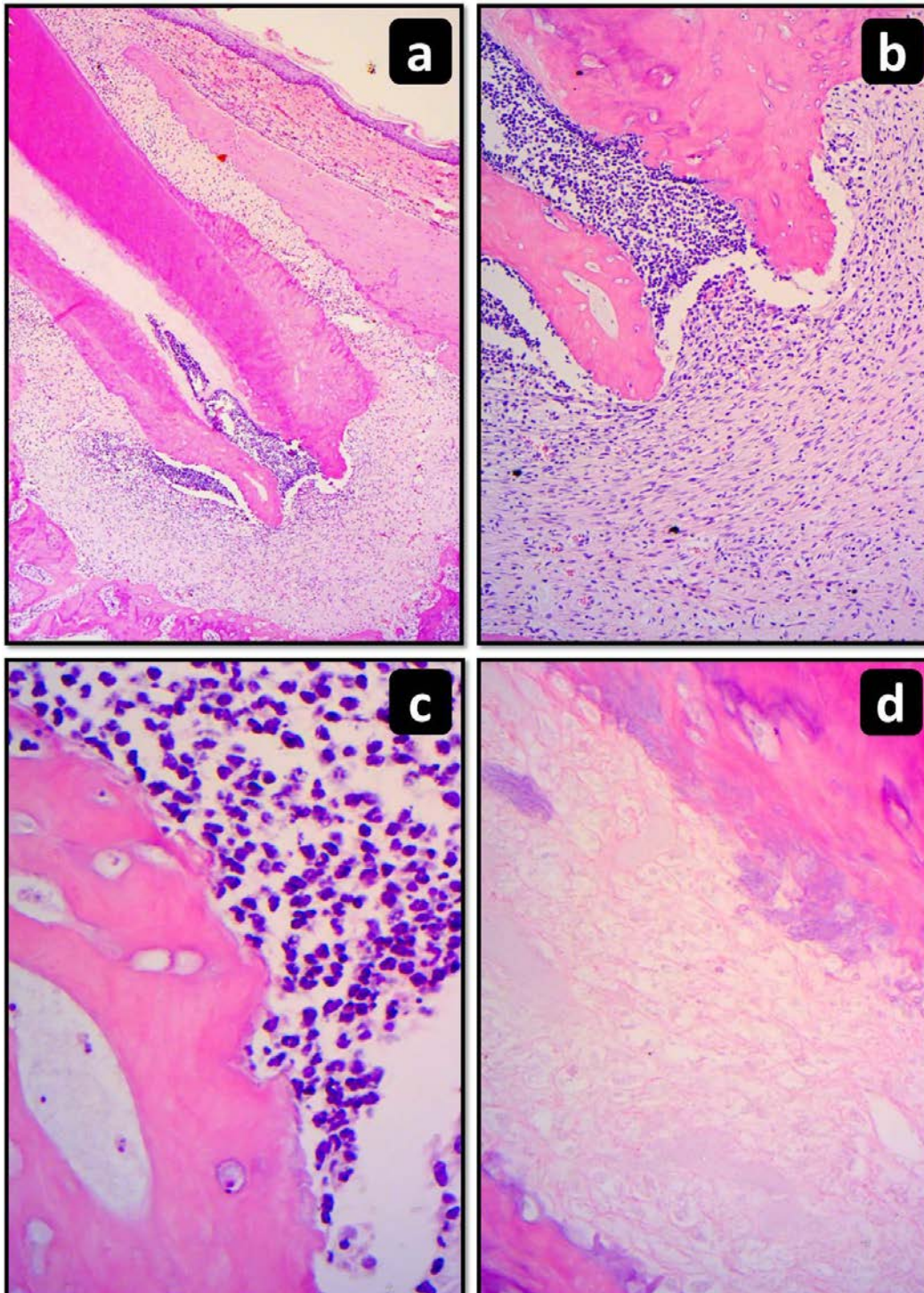


Figura 12: Imagens representativas do grupo LP: (a) aspecto microscópico panorâmico do periápice dentário evidenciando presença de inflamação, desorganização do ligamento periodontal e área de reabsorção óssea [10x - H.E.]; (b) Periápice dentário evidenciando presença de infiltrado inflamatório crônico [100x - H.E.]; (c) presença de infiltrado inflamatório crônico e moderada área de reabsorção cementária [400x – H.E.]; (d) tecido pulpar necrosado [400x – H.E.].

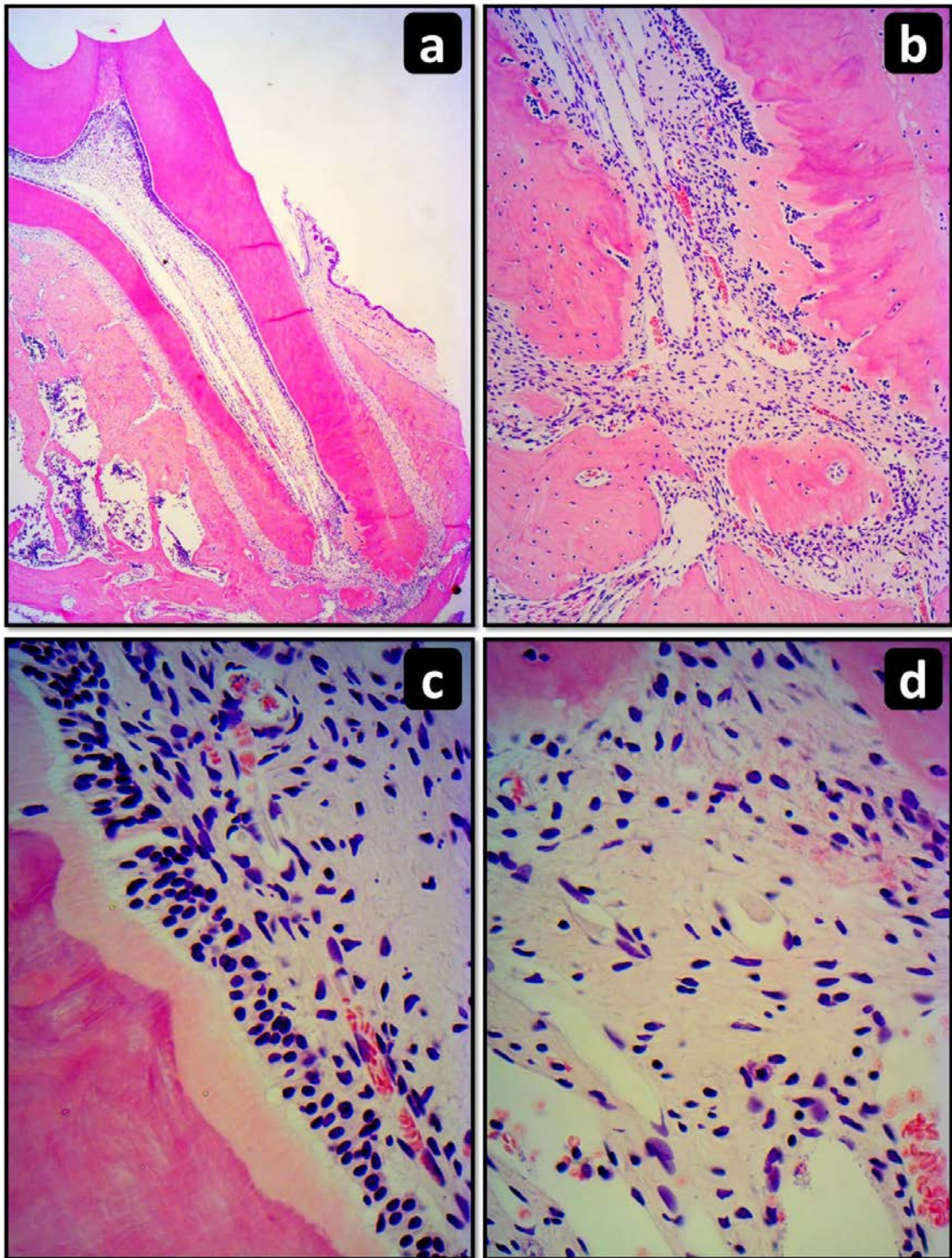


Figura 13: Imagens representativas do grupo D: (a, b) periápice dentário demonstrando tecidos pulpares e periodontais com aspectos de normalidade [10x e 100x - H.E.]; (c) polpa dentária demonstrando dentina, pré-dentina e odontoblastos com aspectos de normalidade [400x - H.E.]; (d) periápice com ausência de inflamação e integridade tecidual [400x - H.E.].

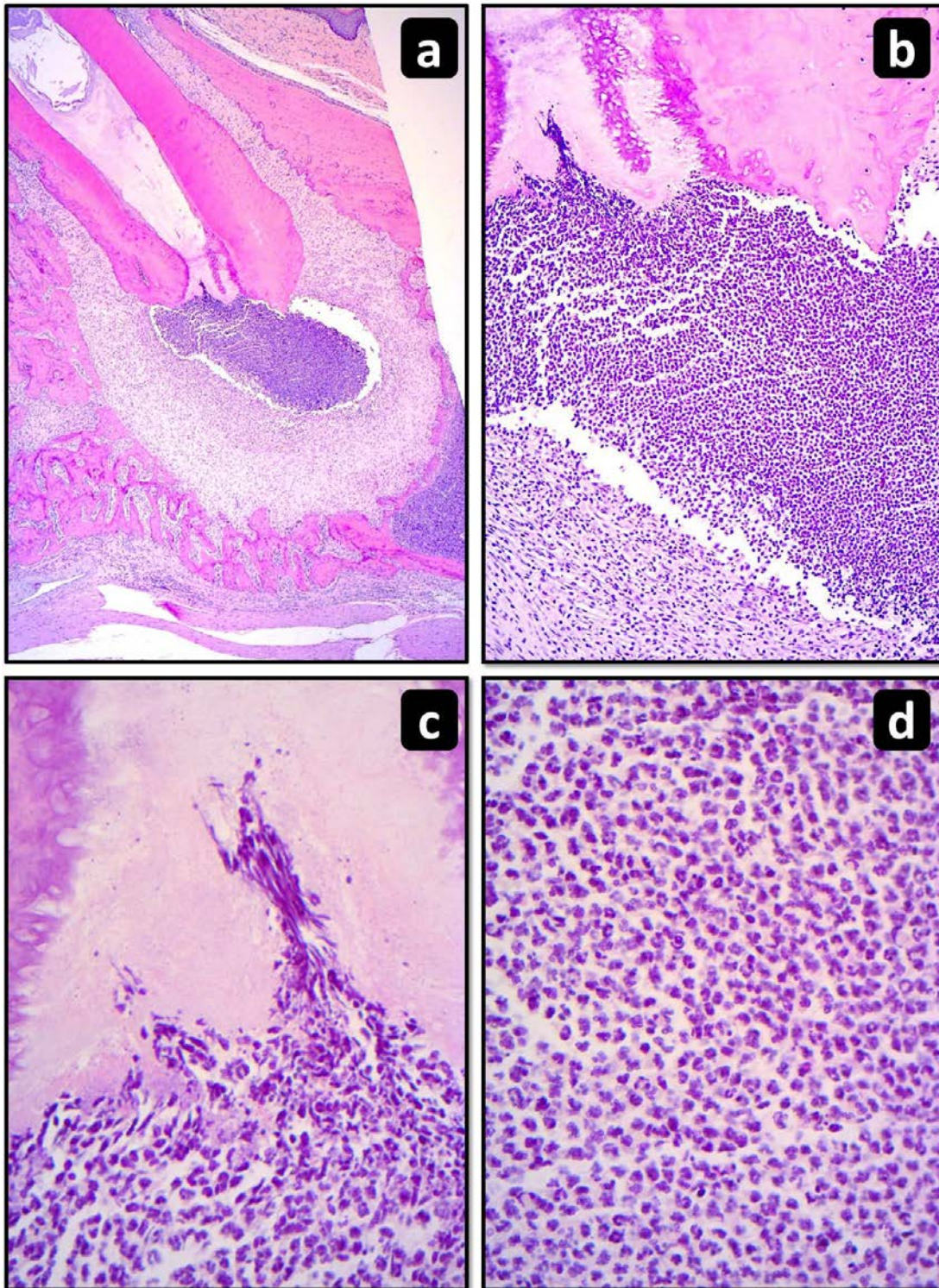


Figura 14: Imagens representativas do grupo D+LP: (a, b) aspecto microscópico panorâmico do periápice dentário evidenciando presença de inflamação, desorganização do ligamento periodontal e área de reabsorção óssea [10x e 100x - H.E.]; (c) necrose do tecido pulpar e reabsorção cementária [400x – H.E.]; (d) infiltrado inflamatório agudo com grande concentração de neutrófilos [400x – H.E].

Tabela 9- Representação dos scores atribuídos para os critérios de intensidade do infiltrado inflamatório e extensão da inflamação, reabsorção óssea e das médias de área da lesão periapical (μm^2).

| Critérios de análise | GRUPOS | | | | |
|-------------------------------------|---------------------------|----------------|---|----------------|---|
| | Scores | E | LP | D | D+LP |
| Intensidade da inflamação | 1 | 10/10 | 0/10 | 10/10 | 0/10 |
| | 2 | 0/10 | 1/10 | 0/10 | 0/10 |
| | 3 | 0/10 | 7/10 | 0/10 | 3/10 |
| | 4 | 0/10 | 2/10 | 0/10 | 7/10 |
| | Mediana | 1 ^a | 3 ^b | 1 ^a | 4 ^b |
| Extensão da inflamação | 1 | 10/10 | 0/10 | 10/10 | 0/10 |
| | 2 | 0/10 | 3/10 | 0/10 | 0/10 |
| | 3 | 0/10 | 5/10 | 0/10 | 2/10 |
| | 4 | 0/10 | 2/10 | 0/10 | 8/10 |
| | Mediana | 1 ^a | 3 ^b | 1 ^a | 4 ^c |
| Presença de Reabsorções radiculares | 1 | 10/10 | 0/10 | 10/10 | 0/10 |
| | 2 | 0/10 | 1/10 | 0/10 | 0/10 |
| | 3 | 0/10 | 8/10 | 0/10 | 4/10 |
| | 4 | 0/10 | 1/10 | 0/10 | 6/10 |
| | Mediana | 1 ^a | 3 ^b | 1 ^a | 4 ^c |
| Área da lesão periapical | Média (μm^2) | 0 ^a | 75,4x10 ⁴ ±11,2 ^b | 0 ^a | 93,6x10 ⁴ ±19,3 ^c |

Letras sobrescritas diferentes (a,b,c) em linhas representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Após a comparação entre os 4 grupos experimentais (E x LP x D x D+LP) para os critérios intensidade do infiltrado inflamatório, extensão do infiltrado inflamatório e para a presença de reabsorções radiculares, foram observadas diferenças esperadas quando entre o grupo E ou D com os grupos de infecção local presente (Grupos LP e D+LP). Este aspecto revela que a indução da infecção endodôntica promoveu alterações nos tecidos periapicais de forma significativa quando comparado ao grupo de ratos sem infecção. Por outro lado a presença da diabetes isoladamente não promoveu o aparecimento de inflamação ou reabsorção radicular em nenhum dos tecidos estudados no período estudado. Quando se comparou o grupo LP x D+LP, encontrou-se diferenças

estatísticas nos critérios extensão da inflamação, área da LP e reabsorções radiculares. Porém, o critério intensidade da inflamação apesar de apresentarem frequências de escores diferentes, o teste de Kruskal Wallis não foi sensível para detectar tal diferença, assim, optou-se pelo cruzamento isolado por meio do teste Mann Whitney. Após o cruzamento entre os grupos com doença pulpar associada ou não a diabetes (LP x D+LP) por meio do teste Mann Whitney, pôde-se observar que: a intensidade da inflamação foi diferente ($p=0,0238$) (tabela 9).

Discussão

VII- DISCUSSÃO

No presente estudo foram utilizados ratos Wistar, devido a similaridade anatômica dos tecidos pulpares e periapicais em relação aos humanos. Nestes animais são identificados o complexo dentinho pulpar, as fibras colágenas do ligamento periodontal, o cemento celular e acelular e o osso alveolar. Com relação à estrutura dos tecidos dentários dos ratos Wistar, as dimensões de cada estrutura são diferentes dos humanos, entretanto a utilização de grupos controle permite identificar a destruição tecidual dos grupos experimentais em proporções relativas às originais.

Modelos diabéticos em animais, dentro da pesquisa científica, conduzem a esclarecimentos e descobertas da doença humana, o que proporciona avanços clínicos, terapêuticos e preventivos aos pacientes. Há diversas opções para obter um modelo experimental da diabetes mellitus. A escolha do presente estudo foi o método químico utilizando a droga aloxano que, segundo a revisão de literatura de Rohilla & Shahjad 2012, é um modelo reproduzível e confiável. O sucesso desta droga depende da via de administração, da dose da droga e do estado nutricional do animal (Fredeuriuk et al., 2004). Existem trabalhos recentes com modelo animal diabético induzido por aloxano (Ezejiofor et al., 2013; Zhao et al., 2014; Omeh et al., 2014; Lachin et al., 2014), incluindo estudos específicos de animais diabéticos e relações orais (Leite et al., 2010a; Leite et al., 2010b; de Almeida et al., 2008). O aloxano possui dois mecanismos de ação na indução da diabetes, um deles interfere na secreção de insulina pela células beta, por meio da inibição específica da glucoquinase, que é o sensor de glicose da célula beta, e o outro mecanismo é o da formação de espécies reativas de oxigênio que resulta na necrose seletiva das células beta causando um estado de diabetes dependente de insulina (Lenzen, 2008). A diabetes induzida por aloxano apresenta no animal sintomas típicos da diabetes no homem, tais como perda de peso, polidipsia, poliúria, glicosúria, cetonúria, hiperglicemia e cetonemia (Lenzen e Panten, 1988).

Quanto ao método de indução da infecção pulpar, observou-se que ele produziu alterações semelhantes entre os espécimes de um mesmo grupo. Este aspecto denota que a indução foi realizada com sucesso e pode ser empregada em pesquisas que envolvem os tecidos do endodonto, assim como demonstrado em outros estudos (Iwama et al., 2003, 2006; Armada-Dias et al., 2006; Kakehashi et al., 1965; Garber et al., 2009, Cintra et al., 2012).

Os ratos diabéticos (D e D+LP) apresentaram perda de massa corporal durante o período experimental, com diferença estatística em relação aos ratos normais (E e LP). Essa diferença na massa corporal se deve ao fato, de que a diminuição de insulina conduz o metabolismo ao estado catabólico causando grave depleção de reservas energéticas e proteínas, principalmente as encontradas no músculo esquelético (Nair et al., 1983,1995; Hebert & Nair, 2010).

Quanto aos resultados obtidos com a análise glicêmica, podemos considerar que os grupos de ratos euglicêmicos (E e LP) apresentaram médias glicêmicas semelhantes, demonstrando que uma única infecção endodôntica não é capaz de influenciar na concentração glicêmica de ratos não diabéticos até o período estudado.

Observou-se que a associação diabetes e infecção local de origem endodôntica não conseguiu elevar a concentração glicêmica (grupos D e D+LP). Portanto, uma única LP não foi capaz de aumentar significativamente a glicemia em ratos diabéticos, assim como visto no estudo de Armada-Dias et al. Por outro lado, a presença da doença periodontal se mostra capaz de influenciar no controle metabólico (Jung et al., 2014), e possivelmente a lesão periapical associada a doença periodontal potencializa esse aumento glicêmico (Cintra et al., 2013).

Quanto aos resultados obtidos com a análise microscópica, os critérios intensidade e extensão do infiltrado inflamatório nos grupos sem LP (E e D) não apresentaram inflamação, ou seja, a presença da diabetes não induziu ou favoreceu o aparecimento de inflamação nos tecidos pulpaes e periapicais até o período de 30 dias. Por outro lado, com relação aos grupos com LP (LP e D+LP) houve aumento da extensão e da intensidade do infiltrado inflamatório quando a diabetes estava presente, e estes achados estão de acordo com outros estudos que se propuseram a avaliar a infecção endodôntica em associação com a diabetes (Fouad et al., 2002; Iwama et al., 2003; Armada-Dias et al., 2006; Cintra et al., 2014ab). Desta forma, confirma-se a evidência de que a diabetes influencia na progressão da inflamação junto aos tecidos bucais estendendo o processo inflamatório mais rapidamente, de forma a comprometer a integridade tecidual em menor período de tempo.

No que diz respeito à presença de reabsorções radiculares, foi observado uma diferença entre os grupos com LP (LP e E) e sem (D e D+LP), mostrando que a presença da doença pulpar promove o aparecimento de reabsorções radiculares. A

literatura demonstra estudos que avaliaram a presença de bactérias, sua distribuição no sistema de canais e sua relação com a presença de lacunas de reabsorção em casos de necrose pulpar (Tanomaru-Filho et al., 2005; Tanomaru et al., 2008; Guo & Wang 2009; Borlina et al., 2010), e assim como evidenciado no presente estudo, a presença de reabsorções radiculares está diretamente associada à presença de microrganismos no interior dos túbulos dentinários e ramificações do canal principal (Borlina et al., 2010). As reabsorções radiculares ocorreram em maior número no grupo D+LP do que no grupo LP, este pode ser atribuído a condição diabética, que dificulta a defesa do organismo, favorecendo a proliferação bacteriana nos canais radiculares (Iwana et al., 2006).

As lesões periapicais do grupo D+LP foram maiores do que as do grupo LP, desta forma, confirma-se que a diabetes influencia na rápida progressão da inflamação junto aos tecidos bucais no período de 30 dias. As lesões periapicais maiores em diabéticos se deve ao fato que a condição hiperglicêmica interfere na função de macrófagos (Garber et al., 2009), circulação sanguínea pulpar (Bender & Bender, 2003), crescimento e diferenciação celular de osteoblastos (Zayzafoon et al., 2000), homeostase óssea (Mathieu et al., 2005) e carga bacteriana (Iwana et al., 2006).

Quanto à análise dos parâmetros do metabolismo oxidativo, no soro sanguíneo, em modelo diabético experimental com lesão periapical induzida, encontramos diferenças estatísticas em alguns parâmetros analisados. Alguns parâmetros não foram possíveis de comparar com os dados presentes na literatura, devido à ausência de estudos semelhantes. Muitas vezes partiu-se para a comparação em estudos que abordavam os mesmos parâmetros, porém na doença periodontal, já que, esta possui patogênese semelhante a periodontite apical, sendo ambas as desordens inflamatórias em resposta a um agressor que resulta no aumento de mediadores inflamatórios seguido de destruição tecidual (Silva et al., 2007).

A albumina, antioxidante endógeno, analisada pelo método verde de bromocresol, no soro dos grupos de ratos diabéticos (D e D+LP) apresentou uma diminuição de sua concentração em relação aos grupos euglicêmicos (E e LP). Este decréscimo é explicado pela própria condição da doença diabetes, a hiperglicemia, que é responsável por desencadear vários eventos como a formação de produtos finais de glicação avançada, espécies reativas de oxigênio, ativação da proteína kinase C, fatores

de crescimento , que conduzem a formação de lesões renais por diferentes mecanismos como lesão endotelial, hipertrofia e mudança da arquitetura glomerular renal (Fierro, 2009; Heras et al., 2001; Wendt et al., 2003; Lee et al., 1989). Quando há continuidade do descontrole glicêmico, ocorre a microalbuminúria, que é sinal clínico da nefropatia diabética (Mogensen & Christensen, 1984; Mogesen, 1987), persistindo o descontrole glicêmico, esta condição evolui para o quadro de doença renal crônica (DRC), que tem como um de seus sinais clínicos a proteinúria, incluindo a albumina (Remuzzi et al., 1997). Com a grande perda de albumina na urina, ocorre a hipoalbuminemia, que é uma das variáveis mais frequentemente utilizadas para avaliar o estado nutricional e/ou inflamatório de um paciente com DRC (Greene et al., 2005).

Na mensuração da albumina, a LP foi capaz de alterar a concentração do antioxidante no soro sanguíneo em ratos diabéticos aos 30 dias experimentais. É interessante ressaltar que, na literatura científica, não há estudos que correlacionam LP com albumina sérica.

A concentração sérica do antioxidante endógeno ácido úrico, dosada pelo método enzimático colorimétrico uricase, foi estatisticamente maior nos grupos de ratos diabéticos (D e D+LP) em relação aos euglicêmicos (E e LP). A diabetes causa nefropatia e posteriormente doença renal crônica (DRC), e o ácido úrico é um marcador de DRC (Nakagawa et al., 2006), o que explica a hiperuricemia nos ratos diabéticos. O aumento de ácido úrico no grupo D+LP em relação ao D é sugestivo de que LP foi capaz de potencializar o quadro diabético. Estudos que relacionam LP e ácido úrico são ausentes na literatura. Existem evidências que a DP agrava o quadro de DRC, devido ao aumento da carga inflamatória, principalmente a proteína C reativa (Menon et al., 2003; Wahid et al., 2013), fato que pode ser extrapolado para a LP.

A bilirrubina, mensurada, por meio do método, Van Der Bergh, não apresentou diferença estatística entre os grupos, aos 30 dias experimentais. Acredita-se que bilirrubina e diabetes possuem uma relação inversa (Cheriyath et al., 2010), e um dos mecanismos é via heme oxigenase, que aumenta a produção e sensibilidade da insulina melhorando o metabolismo da glicose (Ndisang & Jadhav, 2009). Até o presente momento, não há estudos que envolvam bilirrubina e LP, no entanto, uma correlação inversa entre bilirrubina e doença periodontal é destacada, sugerindo que há um

envolvimento da bilirrubina na inibição de vias inflamatórias comuns a doença periodontal (Chapple et al, 2007).

A avaliação de TAC sérica realizada não mostrou diferença estatística. Existe ausência de estudos, que avaliam TAC sérica associada a LP envolvendo ou não diabetes. Contudo na literatura, relata-se aumento de TAC no tecido da LP (Dezerega et al, 2012), e aumento de TAC sérica na presença de DP (Žilinskas et al, 2011; Chapple et al, 2007), porém, sem envolvimento com diabetes.

O parâmetro oxidante avaliado no presente modelo de estudo foi o produto final da peroxidação lipídica, o MDA, que teve sua concentração sérica aumentada na presença da diabetes (grupos D e D+LP) comparado aos grupos euglicêmicos (E, LP). Elevadas concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico são observadas nos estudos com modelos diabéticos, segundo a revisão de Maritim et al, 2003. A elevação da concentração de MDA na condição diabética deve-se à hiperglicemia, que induz a formação de RLs, entre eles, o radical hidroxil, que captura o hidrogênio do lípido da membrana plasmática celular, promovendo a LPO (Brunzell & Chait, 1994; Kawamura et al., 1994). Investigações em modelos diabéticos induzidos por aloxano (Mohan & Das, 1998; Sailaja et al., 2000) mostraram um aumento de MDA nestes animais, que vão ao encontro do presente estudo.

Em relação a influencia da LP no MDA sérico, notou-se que na presença da diabetes houve um ligeiro aumento da concentração do oxidante no grupo D+LP em relação ao grupo D, porém, sem diferença estatística. A literatura relata aumento de produtos finais de LPO no tecido da LP e nas hemácias dos portadores desta, mostrando uma influencia da LP no contexto sistêmico (Cherkashin et al., 1989; Marton et al., 1993), assim como a DP, que é capaz de aumentar a concentração sérica de MDA sanguíneo (Sobaniec & Sobaniec-Lotowska, 2000; Dalai et al., 2013; Sonoki et al., 2006).

Diante dos resultados do metabolismo oxidativo, é interessante ressaltar que as alterações encontradas nas concentrações séricas dos antioxidantes (aumento de ácido úrico e diminuição de albumina) devido à presença da LP no rato diabético, revela uma interação entre LP e diabetes, evidenciando que a LP é capaz de potencializar a DRC em ratos diabéticos.

Conclusão

VIII- CONCLUSÃO

Concluiu-se que:

- **Quanto à análise dos parâmetros do metabolismo oxidativo:**

- a diabetes influencia nas concentrações séricas de MDA, albumina e ácido úrico;

- a infecção endodôntica diminui as concentrações séricas de albumina e aumenta de ácido úrico em ratos diabéticos.

- **Quanto à análise microscópica:**

- A diabetes potencializa o desenvolvimento da doença endodôntica induzida, aumentando a extensão e intensidade da inflamação, a presença de reabsorções radiculares externas e área da lesão periapical.

Referências

IX- REFERÊNCIAS

1. Akalin FA, Baltacioğlu E, Alver A, Karabulut E. Total Antioxidant Capacity and Superoxide Dismutase Activity Levels in Serum and Gingival Crevicular Fluid in Pregnant Women With Chronic Periodontitis. *J Periodontol* 2009; 80:457-67.
2. Alaçam A, Tulunoglu O, Oygür T, Bilici S. Effects of topical Catalase application on dental pulp tissue: a histopathological evaluation. *J Dent* 2000 ;28:333-39.
3. Allen EM, Matthews JB, O' Halloran DJ, Griffiths HR, Chapple IL. Oxidative and inflammatory status in Type 2 diabetes patients with periodontitis. *J Clin Periodontol* 2011;38:894-901.
4. Amatyakul S, Chakraphan D, Chotipaibulpan S, Patumraj S. Role of exercise training on pulpal blood flow in diabetic rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2000;634:295-301.
5. American Dental Association. Standards of medical care in diabetes. *Diab Car* 2014;37:S14-80.
6. Armada-Dias L, Breda J, Provenzano JC, Breitenbach M, Rôcas IN, Gahyva SM et al. Siqueira-Junior JF. Development of periradicular lesions in normal and diabetic rats. *J Appl Oral Sci* 2006;14:371-75.
7. Astolpho RD, Curbete MM, Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, Prieto AKC et al. Periapical Lesions Decrease Insulin Signal and Cause Insulin Resistance. *J Endod* 2013;39:648-52.
8. Awodele O, Olayemi SO, Nwite JA, Adeyemo TA. Investigation of the levels of oxidative stress parameters in HIV and HIV-TB co-infected patients. *J Infect Dev Ctries* 2012;6:79-85.
9. Bachschmid MM, Schildknecht S, Matsui R, Zee R, Haeussler D, A Cohen R, Pimental D, Loo BV. Vascular aging: Chronic oxidative stress and impairment of redox signaling-consequences for vascular homeostasis and disease. *Ann Med* 2013;45:17-36.
10. Basta G , Schmidt AM , De Caterina R . Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res* 2004;63:582-92.
11. Baumgardner KR, Sulfaro MA. The anti-inflammatory effects of human

- recombinant copper-zinc superoxide dismutase on pulp inflammation. *J Endod* 2001;27:190-5.
12. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabet* 1999;48:1-9.
 13. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabet* 1991;40:405-12.
 14. Bender IB, Bender AB. Diabetes mellitus and the dental pulp. *J Endod* 2003; 29:383-89.
 15. Borlina SC, de Souza V, Holland R, Murata SS, Gomes-Filho JE, Dezan Junior E, Marion JJ, Neto Ddos A. Influence of apical foramen widening and sealer on the healing of chronic periapical lesions induced in dogs' teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:932-40.
 16. Brito LR, Katz J, Guelmann M, Heft M. Periradicular radiographic assessment in diabetic and control individuals. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96:449-52.
 17. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabet* 2005;54:1615-25.
 18. Brunzell IB, Chait AJD. Reduced plasma peroxy radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabet* 1994;43:1010-14.
 19. Catanzaro O, Dziubecki D, Lauria LC, Ceron CM, Rodriguez RR. Diabetes and its effects on dental pulp. *J Oral Sci* 2006;48:195-99.
 20. Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 2000; 49:S27-9.
 21. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979;59:527-605.
 22. Chapple ILC, Milward MR, Dietrich T. The Prevalence of Inflammatory Periodontitis Is Negatively Associated with Serum Antioxidant Concentrations. *J Nutr* 2007;137:657-64.
 23. Cherkashin SI. Lipid peroxidation in persons with chronic odontogenic foci of infection. *Stomatol* 1989; 68:15-7.
 24. Chesne S, Rondeau P, Armenta Sand Bourdon E. Effects of oxidative modifications induced by the glycation of bovine sérum albumin on its

- structure and on cultured adipose cells. *Biochemie* 2006;88:1467-77.
25. Cintra LTA, Samuel RO, Facundo ACS, Prieto AKC, Sumida DH, Bomfim SRM, Souza JC, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. *Inter Endod J* 2014a;47:228-37.
 26. Cintra LTA, da Silva Facundo AC, Azuma MM, Sumida DH, Astolpho RD, Bomfim SR et al. Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats. *Clin Oral Investig* 2013a;17:1595-9.
 27. Cintra LTA, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, de Lima VM et al. Apical periodontitis and periodontal disease increase serum IL-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. *Clin Oral Investig*. In press 2014b.
 28. Cintra LTA, da Silva Facundo AC, Valentim D, Prieto AKC, Silva CO, Sumida DH et al. Effect of Oral Infections on Serum Creatinine Levels in Diabetic Rats. *Inter J Diabet & Vascul Diseas Resear* 2013b;1:1-6.
 29. Cheriya P, Gorrepati VS, Peters I, Nookala V, Murphy ME, Srouji N, Fischman D. High Total Bilirubin as a Protective Factor for Diabetes Mellitus: An Analysis of NHANES Data From 1999 – 2006. *J Clin Med Res*. 2010; 2:201–206.
 30. Cintra, LTA, Da Silva Facundo AC, Prieto AKC, Sumida DH, Narciso LG, Mogami Bomfim et al. Blood Profile and Histology in Oral Infections Associated with Diabetes. *J Endod* 2014c;40:1139-44
 31. Colic 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; 39:690-6.
 32. Cotinguiba GG, Silva JRN, Azevedo RRS, Rocha TJM, dos Santos AF. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúd* 2013;15:231-7.
 33. Dalai C, Ignat-Romanul I, Roşca E, Mureşan M, Micle O, Bodog F, Dalai C. Correlation between histopathological aspects of periodontitis and biochemical changes of oxidative stress. *Rom J Morphol Embryol* 2013;54:S817-22.
 34. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy

- in rats with diabetes. *J Periodontol* 2008;79:2156-65.
35. Deby C, Goutier R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochem Pharmacol* 1990;39:399-405.
 36. Dehghan A, van Hoek M, Sijbrands EJ, Hofman A, Witteman JC. High serum uric acid as a novel risk factor for type 2 diabetes. *Diabet Car* 2008;31:361-62.
 37. Dezerega A, Madrid S, Mundi V, Valenzuela MA, Garrido M, Paredes R, et al. Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response. *J Inflamm*. In press 2012.
 38. Dias CAR, Moura PMSS, D'Angeliz CEM. A complexa interação entre radicais livres, suplementação e doenças. *Rev Multidiscip* 2010;10:34-43.
 39. Doumas BT, Watson WA and Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971;31:87-96.
 40. Droge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 2002;82:47-95.
 41. Dunn OJ. Estimation of the means of dependent variables. *Ann Math Statist* 1958; 29:1095-1111.
 42. Edwards NL. The role of hyperuricemia and gout in kidney and cardiovascular disease. *Cleve Clin J Med* 2008;75:S13-6.
 43. Edwards NL. The role of hyperuricemia in vascular disorders. *Curr Opin Rheumatol* 2009;21:132-37.
 44. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004;37:277-85.
 45. Esposito P, Varvara G, Caputi S, Perinetti G. Catalase activity in human healthy and inflamed dental pulps. *Int Endod J* 2003;36:599-603.
 46. Etöz OA, Akçay H, Neşelioğlu S, Erel Ö, Alkan A. Total antioxidant capacity and total oxidant status of synovial fluids in patients with temporomandibular joint pain and dysfunction. *Clin Oral Invest Clin Oral Investig* 2012;16:1557-61.

47. Ezejiofor AN, Okorie A, Orisakwe OE. Hypoglycaemic and tissue-protective effects of the aqueous extract of persea americana seeds on alloxan-induced albino rats. *Malays J Med Sci* 2013;20:31-9.
48. Federiuk IF, Casey HM, Quinn MJ, Wood MD, Ward WK. Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. *Comp Med* 2004;54:252-7.
49. Ferreira MM, Carrilho E, Carrilho F. Diabetes mellitus and its influence on the success of endodontic treatment: a retrospective clinical study. *Acta Med Porto* 2014;27:15-22.
50. Fierro JAC. Nefropatía diabética: fisiopatología, diagnóstico, evolución clínica y epidemiología. *Rev Med Clin Condes* 2009;20:639-50.
51. Fouad AF, Barry J, Russo J, Radolf J, Zhu Q. Periapical lesion progression with controlled microbial inoculation in a type I diabetic mouse model. *J Endod* 2002;28:8-16.
52. Fouad AF, Burleson J. The effect of diabetes mellitus on endodontic treatment outcome: data from an electronic patient record. *J Am Dent Assoc* 2003;134:43-51.
53. Fouad AF. Diabetes mellitus as a modulating factor of endodontic infections. *J Dent Educ* 2003; 67:459-67
54. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978;201:875-80.
55. Fuhua P, Xuhui D, Zhiyang Z, Ying J, Yu Y, Feng T, et al. Antioxidant status of bilirubin and uric acid in patients with myasthenia gravis. *Neuroimmunomodul* 2012;19:43-9.
56. Ganz MB, Seftel A. Glucose-induced changes in protein kinase C and nitric oxide are prevented by vitamin E. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278:146-52.
57. Gao X, Xu Y, Xu B, Liu Y, Cai J, Liu HM, et al. Allopurinol attenuates left ventricular dysfunction in rats with early stage of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2012 28:409-17.
58. Garber SE, Shabahang S, Escher AP, Torabinejad M. The effect of hyperglycemia on pulpal healing in rats. *J Endod* 2009;35:60-62.
59. Gate L, Paul J, Nguyen Ba G, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed & Pharmacother*

- 1999;53:169-80.
60. Ge J, Ji J, Wang T. Superoxide dismutase and malonyl dialdehyde in human pulp tissue. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 1996;31:201-3.
 61. George J, Struthers AD. Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. *Vasc Health Risk Manag* 2009;5:265-72.
 62. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010;107:1058-70.
 63. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products. Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circul* 2006;114:597-605.
 64. Gorowiec MR, Borthwick LA, Parker SM, Kirby JA, Saretzki GC, Fisher AJ. Free radical generation induces epithelial-to-mesenchymal transition in lung epithelium via a TGF- β 1-dependent mechanism. *Free Radic Biol Med* 2012;52:1024-32.
 65. Greene T, Wang X, Menon V, et al. C-reactive protein and albumin as predictors of all-cause and cardiovascular mortality in chronic kidney disease. *Kidn Internat* 2005;1:93-9.
 66. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;103:137-49.
 67. Guo HJ, Wang JD. Bacterial biofilm on the apical external root surfaces of human teeth associated with chronic periradicular lesions. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2009;18:571-4.
 68. Halliwell B and Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* (4th ed.). Oxford, UK: Clarendon, 2007.
 69. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246: 501-14.
 70. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990;186:1-85.
 71. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the

- results mean? *Br J Pharmacol* 2004;142: 231-55.
72. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992; 59:1.609-23.
 73. Halliwell B. Albumin an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol* 1988;37:569-71.
 74. Hassan SZ, Gheita TA, Kenawy SA, Fahim AT, El-Sorougy IM, Abdou MS. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: relationship to disease manifestations and activity. *Int J Rheum Dis* 2011;14:325-31.
 75. Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y, Noguchi M. Characterization of rat hemoxygenase-3gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase - 2 gene. *Gene* 2004; 336:241-50.
 76. Hebert SI, Nair KS. Protein and energy metabolism in type 1 diabetes. *Clin Nutr* 2010;29:13-17.
 77. Heras MM, Jerez MM, Coronel F. Nefropatía diabética: fisiopatología y curso clínico. *Nefrol* 2001;21:24-31.
 78. Holland R, Mazuqueli L, de Souza V, Murata SS, Dezan Júnior E, Suzuki P. Influence of the type of vehicle and limit of obturation on apical and periapical tissue response in dogs' teeth after root canal filling with mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2007;33:693-7.
 79. Holme I, Aasteveit AH, Hammar N, Jungner I, Walldius G. Uric acid and risk of myocardial infarction, stroke and congestive heart failure in 417,734 men and women in the Apolipoprotein Mortality Risk study (AMORIS). *J Intern Med* 2009;266:558-70.
 80. Huang D, Ou B, Prior RL. J. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Agric Food Chem* 2005;53:1841:56.
 81. Hulsmans M, Van Dooren E, Holvoet P. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Risk of Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2012;14:264-76.
 82. Hunt JV, Smith CCT, Wolff SP. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabet* 1990;39:1420-24.
 83. Huntley AC. Diabetes Mellitus: Review. *Dermatol Online J.* 1995;1:4.

84. Inagaki Y, Yoshida K, Ohba H, Seto H, Kido J, Haneji T, Nagata T. High glucose levels increase osteopontin production and pathologic calcification in rat dental pulp tissues *J Endod* 2010;36:1014-20.
85. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000;49:1939-45.
86. Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh Takashi, Kakimoto M, Sonoda N et al. Protein kinase C–dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:S227–S232.
87. Iwama A, Morimoto T, Tsuji M, Nakamura K, Higuchi N, Imaizumi I, Shibata N, Yamasaki M, Nakamura H. Increased number of anaerobic bacteria in the infected root canal in type 2 diabetic rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:681-86.
88. Iwama A, Nishigaki N, Nakamura K, Imaizumi I, Shibata N, Yamazaki M, Nakamura H, Kameyama Y, Kapila Y. The effect of high sugar intake on the development of periradicular lesions in rats with type 2 diabetes. *J Dent Res* 2003;82:322-25.
89. MJ. The integrated antioxidants systems. *Nutr Res* 1985;15:755-65.
90. Johnson RJ, Perez-Pozo SE, Sautin YY, et al. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? *Endocr Rev* 2009;30:96-116.
91. Johnson RJ, Kang DH, Feig D, Kivlighn S, Kanellis J, Wanatabe S, Tuttle KR, Rodriguez-Iturbe B, Herrera-Acosta J, Mazzali M. Is There a Pathogenetic Role for Uric Acid in Hypertension and Cardiovascular and Renal Disease? *Hypertens* 2003;41:1183-90.
92. Jung YS 1, Shin MH, Kweon SS, Lee YH, Kim JO, Kim YJ, Chung HJ, Kim OS. Periodontal disease associated with blood glucose levels urban Koreans aged 50 years or more of study: Dong-gu. *Gerodontol*. In press 2014.
93. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.

94. Kaliora AC, Dedoussis GVZ, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atheroscler* 2006;187:1.
95. Kawamura M, Heinecke JW, Chait A. Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway. *J Clin Invest* 1994;94:771-78.
96. Keizman D, Shalom MI, Berliner S, Maimon N, Vered Y, Artamonov I, Tsehor J, Nefussy B., DroryLow VE. Uric acid levels in serum of patients with ALS: Further evidence for oxidative stress? *J Neurol Sciences* 2009;285:95-9.
97. Kim H, Yun JE, Jo J, Jee SH. Low serum bilirubin level as an independent predictor of stroke incidence: a prospective study in Korean men and women. *Stroke* 2009;40:3422-27.
98. Kim KJ, Yoon KY, Hong HD, Lee BY. Schisandra chinensis Prevents Hepatic Lipid Peroxidation and Oxidative Stress in Rats Subjected to Heat Environmental Stress. *Phytother Res* 2012;26:1674-80.
99. Kodama Y, Matsuura M, Sano T, Nakahara Y, Ozaki K, Narama I, Matsuura T. Diabetes enhances dental caries and apical periodontitis in caries-susceptible WBN/KobSlc rats. *Comp Med* 2011;61:53-9
100. Kohsaka T 1 , Kumazawa M , Yamasaki M , H Nakamura .Periapical lesions in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Endod* 1996;22:418-21.
101. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1998;101:160-9.
102. Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T et al. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulat* 2000;101:676-81.
103. Kumar D, Pandey RK, Agrawal D, Agrawal D. An estimation and evaluation of total antioxidant capacity of saliva in children with severe early childhood caries. *Int J Paediatr Dent* 2011;21:459-64
104. Kuskoski M, Asuero A, Troncoso A. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc*

Tecnol Aliment. 2005;25:726-32.

105. Lachin T. Effect of antioxidant extract from cherries on diabetes. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2014;8:67-74.
106. Lee TS, Saltsman KA, Ohashi H, King GL. Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:5141-5
107. Lee YH, Kim GE, Song YB, Paudel U, Lee NH, Yun BS, et al. Davallialactone reduces inflammation and repairs dentinogenesis on glucose oxidase-induced stress in dental pulp cells. *J Endod* 2013;39:1401-6.
108. Leite MF, Ganzerla E, Marques MM, Nicolau J. Diabetes induces metabolic alterations in dental pulp. *J Endod* 2008;34:1211-14.
109. Leite MF, Lima AM, Massuyama MM, Otton R. Astaxanthin restores the enzymatic antioxidant profile in salivary gland of alloxan-induced diabetic rats. *Arch Oral Biol* 2010b;55:479-85.
110. Leite MF, De Lima A, Massuyama MM, Otton R. In vivo astaxanthin treatment partially prevents antioxidant alterations in dental pulp from alloxan-induced diabetic rats. *Int Endod J* 2010a;43:959-67.
111. Leite MF, Lima AM, Otton R. Combination of astaxanthin and fish oil supplementation alters antioxidant enzyme profile of dental pulp tissue. *Int Endod J* 2012;45:1109-15.
112. Lenzen S, Panten U: Alloxan: history and mechanism of action. *Diabetol* 1988;31:337-42.
113. Lenzen S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetol* 2008;51:216-26.
114. Liani R, Halvorsen B, Sestili S, Handberg A, Santilli F, Vazzana N, Formoso G, Aukrust P, Davì G. Plasma levels of soluble CD36, platelet activation, inflammation, and oxidative stress are increased in type 2 diabetic patients. *Free Radic Biol Med.* 2012.
115. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Ciênc Farmac* 2001;37:293-303.
116. Lima SM, Grisi DC, Kogawa EM, Franco OL, Peixoto VC, Gonçalves Júnior-JF, Arruda MP, Rezende TM. Diabetes mellitus and inflammatory

- pulpal and periapical disease: a review. *Int Endod J* 2013;46:700-9.
- 117.Lin JP, Vitek L, Schwertner HA. Serum bilirubin and genes controlling bilirubin concentrations as biomarkers for cardiovascular disease. *Clin Chem* 2010;56:1535-43
- 118.Lippi G, Montagnana M, Franchini M, Favalaro EJ, Targher G. The paradoxical relationship between serum uric acid and cardiovascular disease. *Clin Chimica Acta* 2008;392:1-7.
- 119.Liu L, Zhang C, Hu y, Peng B.Liu L1, Zhang C, Hu Y, Peng B. Protective effect of metformin on periapical lesions in rats by decreasing the ratio of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin. *J Endod* 2012;38:943-7.
- 120.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. *J Endod* 2011;37:598-601.
- 121.Lukic A, Danilovic V, Petrovic R. Comparative immunohistochemical and quantitative analysis of inflammatory cells in symptomatic and asymptomatic chronic periapical lesions. *Vojnosanit Pregl* 2008;65:435-40.
- 122.Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17:24-38.
- 123.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. *J Endod* 2012;38:297-300.
- 124.Marton IJ1, Balla G, Hegedus C, Redi P, Szilagy Z, Karmazsin L, et al. The role of reactive oxygen intermediates in the pathogenesis of chronic apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1993;8:254-7.
- 125.Masi S, Salpea KD, Li K, Parkar M, Nibali L, Donos N, Patel K, Taddei S, Deanfield JE, D'Aiuto F, Humphries SE. Oxidative stress, chronic inflammation, and telomere length in patients with periodontitis. *Free Radic Biol Med* 2011;50:730-5.
- 126.Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetol* 2005;48:1247-57.
- 127.Maxwell SR, Dietrich T, Chapple IL. Prediction of serum total antioxidant

- activity from the concentration of individual serum antioxidants. *Clin Chim Acta* 2006;372:188-94.
128. McLennan SV, Heffernan S, Wright L, Rae C, Fisher E, Yue DK, Turtle JR. Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabet* 1991;40:344-48.
129. Men P, Punzo G. Uric acid: bystander or culprit in hypertension and progressive renal disease? *J Hypertens* 2008;26:2085-92.
130. Menon V, Wang X, Greene T, Beck GJ, Kusek JW, Marcovina SM, et al. Relationship between C-reactive protein, albumin, and cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003;42:44-52
131. Mogensen CE, Christensen CK. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *N Engl J Med* 1984;311:89-93
132. Mogensen CE: Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1987;31:673-89.
133. Mohan IK, Das UN. Effect of L-arginine nitric oxide system on chemical induced diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med* 1998;25:757-65.
134. Monteiro AG, Rosário F, Torre JB. Complicações cardiovasculares na diabetes: Prevenções Primária e Secundária nos CSP. *Rev Port Clin Geral Portugal*. 2007;23:627-47.
135. Nair KS, Ford GC, Ekberg K, Fernqvist-Forbes E, Wahren J. Protein dynamics in whole body and in splanchnic and leg tissues in type I diabetic patients. *J Clin Invest* 1995;95:2926-37.
136. Nair KS, Garrow JS, Ford C, Mahler RF, Halliday D. Effect of poor diabetic control and obesity on whole body protein metabolism in man. *Diabetologia* 1983;25:400-3.
137. Nakagawa T, Kang D-H, Feig D, Sanchez-Lozada LG, Srinivas TR, Sautin Y, et al. Unearthing uric acid: An ancient factor with recently found significance in renal and cardiovascular disease. *Kidney Int* 2006;69:1722-5.
138. Nakahara Y1, Sano T, Kodama Y, Ozaki K, Matsuura T. Alloxan-induced hyperglycemia causes rapid-onset and progressive dental caries and periodontitis in F344 rats. *Histol Histopathol* 2012;27:1297-306.
139. Nakahara Y1, Sano T, Kodama Y, Ozaki K, Matsuura T. Glycemic control with insulin prevents progression of dental caries and caries-related

- periodontitis in diabetic WBN/KobSlc rats. *Toxicol Pathol* 2013;41:761-9.
- 140.Ndisang JF, Jadhav A. Heme oxygenase system enhances insulin sensitivity and glucose metabolism in patients with diabetes induced by streptozotocin. *Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:829-41.
- 141.Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of non-surgical root canal treatment: part 2: tooth survival. *Int Endod J* 2011;44:610-25.
- 142.Niamonitos C, Shklar G, Krakow AA. Effects of vitamin E dietary supplements on the exposed dental pulp in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;59:627-36.
- 143.Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787-90.
- 144.Oda E, Kawai R, Sukumaran V, Watanabe K. Uric acid is positively associated with metabolic syndrome but negatively associated with diabetes in Japanese men. *Internal Medicine* 2009;48:1785-91.
- 145.Omeh YN, Onoja SO, Ezeja MI, Okwor PO. Subacute antidiabetic and in vivo antioxidant effects of methanolic extract of *Bridelia micrantha* (Hochst Baill) leaf on alloxan-induced hyperglycaemic rats. *J Complement Integr Med*. In press 2014.
- 146.Papas AM. Antioxidant status diet, nutrition and health. Pp 1-329. CRC Press, UK. 1999.
- 147.Parmar MS. Uric acid and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2009;360:539.
- 148.Patel SP, Rao NS, Pradeep AR. Effect of nonsurgical periodontal therapy on crevicular fluid and serum glutathione peroxidase levels. *Dis Markers* 2012;32:1-7.
- 149.Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical & Medicine* 1999;27:1173-81.
- 150.Puig JG, Martínez MA. Hyperuricemia, gout and the metabolic syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2008;20:187-91.
- 151.Răchișan AL, Hrușcă A, Căinap S, Pop TL, Andreica M, Miu N, Samașca G. The activity of 8-iso-prostaglandin F₂α as an oxidative stress marker in vivo in paediatric patients with type 1 diabetes mellitus and associated

- autoimmunities. *Clin Lab* 2014;60:253-9.
- 152.Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother* 2005;59:365-73.
- 153.Re R, Pelegrinni N, Progentte A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 1999;26,1231-7.
- 154.Remuzzi G, Roggenenti P, Benigni A: Understanding the nature of renal disease progresión. *Kidney Int* 1997;51:2-15.
- 155.Rocha FD, Teixeira VL, Pereira RC, Kaplan MAC. Diabetes mellitus e estresse oxidativo: produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. *Rev Bras Farm* 2006;87:49-54.
- 156.Rohilla A, Ali S. Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects. *Internat J Research Pharmac Biomed Scienc* 2012;3:819-23.
- 157.Rondeau P, Singh N, Caillens H, Bourdon E. Oxidative stress induced by glycated humano r bovine sérum albumins on human monocytes. *Free Radic Biol Med* 2008; 45:799-812.
- 158.Roy-Chowdhury N, Lu Y, Roy-Chowdhury J. “Bilirubin metabolism”, in Rodés EJ, Benhamou JP, Blei AT, Reichen J, and Rizzetto M. *Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice* (3rd ed.) Wiley, NJ: Hoboken, 2008;165-174.
- 159.Ryter SW. Bile pigments in pulmonary and vascular disease. *Front Pharmacol* 2012;8:39.
- 160.Sailaja MMD, Suresh Y, Das. Preservation of the antioxidante status in chemically induced diabetes mellitus by melatonin. *J Pineal Res* 2000;29:108-15.
161. Sakurai T, Tsuchiya S. Superoxide production from nonenzymatically glycated protein. *FEBS letters*1988;236:406-10.
- 162.Sandberg G, Sundberg H, Fjellstrom C, Wikblad K. Type 2 Diabetes and oral health – A comparison between diabetic and non-diabetic subjects. *Diabet Res Clin Pract* 2000;50:27-34.
- 163.Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleos Nucleot Nucleic Acid* 2008;27:608-19.

164. Sayeski PP, Kudlow JE. Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor- α gene transcription. *J Biol Chem* 1996;271:15237-43.
165. Scatchard G, Strong LE, Hughes WL, Ahworth JN, Sparrow AH. Chemical clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation XXVI. The properties of solutions of sérum albumin of low salt content. *J Clin Invest* 1945;24:671-9.
166. Schulz E, Gori T, Münzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens Res* 2011;34:665-73.
167. Schwertner HA, Vitek L. Gilbert syndrome, UGT1A1*28 allele, and cardiovascular disease risk: possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin. *Atheroscler* 2008;198:1-11.
168. Scott GS, Hooper DC: The role of uric acid in protection against peroxynitrite-mediated pathology. *Med Hypotheses* 2001;56:95-100.
169. Scott MD, Lubin BH, Zuo L, Kuypers FA. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *J Lab Clin Med* 1991;118:7-16.
170. Segura-Egea JJ, Castellanos-Cosano L, Machuca G, López-López J, Martín González-J, Velasco-Ortega E, Sánchez-Domínguez B, López-Frías FJ. Diabetes mellitus, periapical inflammation and endodontic treatment outcome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012;17: 356-61.
171. Siegel S. Non-parametric statistic for the behavioral sciences. McGraw-Hill Book Co., New York 1956; 184-94.
172. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J D Res* 2007;86: 306-19.
173. Sobaniec H, Sobaniec-Lotowska ME. Morphological examinations of hard tissues of periodontium and evaluation of selected processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis. *Med Sci Monit* 2000;6:875-81.
174. Soell M, Hassan M, Miliauskaite A, Haikel Y, Selimovic D. The oral cavity of elderly patients in diabetes. *Diabetes Metab* 2007;33:10-8

175. Sonoki K, Nakashima S, Takata Y, Naito T, Fujisawa K, Ootsubo T et al. Decreased lipid peroxidation following periodontal therapy in type 2 diabetic patients. *J Periodontol* 2006;77:1907-13.
176. Spanou C, Veskoukis AS, Kerasioti T, Kontou M, Angelis A, et al. Flavonoid Glycosides Isolated from Unique Legume Plant Extracts as Novel Inhibitors of Xanthine Oxidase. *Plos One* 2012;7:e32214.
177. Stocker R, Yamamoto Y, Mc Donagh Af, Glazer NA, Ames BN. Bilirubin is na antioxidante of possible physiological importance. *Science* 1987;235:1043-6.
178. Strain JJ, Benzie IFF. Antioxidants. In: Encyclopedia of Human Nutrition. New York: *Academic Press*;1998:95-105.
179. Stvolinsky S, Toropova K, Gordeeva M, Kazey V, Sato T, Meguro K, Boldyrev A. Carnosine and its (S)-Trolox™ derivative protect animals against oxidative stress. *Amino Acids* 2012;43:165-70.
180. Tanaka M, Fukui M, Tomiyasu KI, Akabame S, Nakano K, Hasegawa G, Oda Yzayzafoon, Nakamura N. Low serum bilirubin concentration is associated with coronary artery calcification (CAC) *Atheroscler* 2009;206:287-91.
181. Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, da Silva LA, Ito IY. Microbial distribution in the root canal system after periapical lesion induction using different methods. *Braz Dent J* 2008; 19:124-9.
182. Tanomaru-Filho M, Poliselini-Neto A, Leonardo MR, Silva LA, Tanomaru JM, Ito IY. Methods of experimental induction of periapical inflammation. Microbiological and radiographic evaluation. *Int Endod J* 2005;38:477-82.
183. Tayal D, Goswami B, Tyagi S, Chaudhary M, Mallika V. Interaction between dyslipidaemia, oxidative stress and inflammatory response in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Cardiovasc J Afr* 2012; 23:23-7.
184. Tennenberg SD, Finkenauer B, Dwivedi A. Absence of lipopolysaccharide-induced inhibition of neutrophil apoptosis in patients with diabetes. *Arch Surg* 1999;134:1229-34.
185. Tilakaratne A, Soory M. Osteoblastic Responses to LPS, Glucose-oxidised LDL and Minocycline: Therapeutic Targets for Periodontal and

- Cardiometabolic Diseases. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov* 2012;6:73-84.
186. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160:1–40.
187. Verdecchia P, Schillaci G, Reboldi G, Santeusano F, Porcellati C, Brunetti P. Relation between serum uric acid and risk of cardiovascular disease in essential hypertension. The PIUMA study. *Hypertens* 2000;36:1072-78.
188. Vitek L, Ostrow J. D. Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects. *Curr Pharm Des* 2009;15:2869-83.
189. Vitek L, Schwertner HA. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem* 2007;43:1-5.
190. Vlassara H, Palácio MR. Glycoxidation: the menace of diabetes and aging. *Mt Sinai J Med* 2003;70:232-41.
191. Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Internal Med* 2002;251:87-101.
192. Wahid A, Chaudhry S, Ehsan A, Butt S, Khan AA. Bidirectional Relationship between Chronic Kidney Disease & Periodontal Disease. *Pak J Med Sci* 2013;29:211-15.
193. Wang CH, Chueh LH, Chen SC, Feng YC, Hsiao CK, Chiang CP. Impact of diabetes mellitus, hypertension, and coronary artery disease on tooth extraction after nonsurgical endodontic treatment. *J Endod* 2011;37:1-5.
194. Wendt TM, Tanji N, Guo J, Kislinger TR, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Rong LL, et al. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol* 2003;162:1123-37.
195. West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Medicine* 2000;17:171-80.
196. Williams B, B Gallacher, Patel H, Orme C. Glucose-induced protein kinase C regulates vascular permeability factor mRNA expression and production of the peptide by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabet* 1997;46:1497-503.
197. Wolle CF, de Aguiar Zollmann L, Etges A, Vitalis GS, Leite CE, Campos

- MM. Effects of the antioxidant agent tempol on periapical lesions in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Endod* 2012;38:191-5.
198. Wolle CF, Zollmann LA, Bairros PO, Etges A, Leite CE, Morrone FB, Campos MM. Outcome of periapical lesions in a rat model of type 2 diabetes: refractoriness to systemic antioxidant therapy. *J Endod* 2013;39:5:643-7.
199. Xia C, Liu W, Zeng D, Zhu L, X Sun, Sun X. Effect of hydrogen-rich water on oxidative stress, liver function, and viral load in patients with chronic hepatitis B. *Lin Transl Sci* 2013;6:372-5.
200. Xiong H, Wei L, Peng B. Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions. *J Endod* 2009; 35:216-20.
201. Yeh CK, Harris SE, Mohan S, Horn D, Fajardo R, Chun YH, Jorgensen J, Macdougall M, Abboud-Werner S. Hyperglycemia and xerostomia are key determinants of tooth decay in type 1 diabetic mice. *Lab Invest* 2012; 92:868-82.
202. Yoshiuchi K, Matsuhisa M, Katakami N, Nakatami Y, Sakamoto K, Matsuoka T et al. Glycated albumin is a better indicator for glucose excursion than glycated hemoglobina in type 1 and type 2 diabetes. *Endocr J* 2008;55:503-7.
203. Young IS, Tate S, Lightbody JH, McMaster D, Trimble ER. The effects of desferrioxamine and ascorbate on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free Radic Biol Med* 1995;18:833-40.
204. Zayzafoon M, Stell C, Irwin R, McCabe LR. Extracellular glucose influences osteoblast differentiation and c-Jun expression. *J Cell Biochem* 2000;79:301-10.
205. Zhang X, Peng B. Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. *J Endod* 2005;31:574-7.
206. Zhao C, Liao Z, Wu X, Liu Y, Liu X, Lin Z, Huang Y, Liu B. Isolation, Purification, and Structural Features of a Polysaccharide from *Phellinus linteus* and Its Hypoglycemic Effect in Alloxan-Induced Diabetic Mice. *J Food Sci*. In press 2014.
207. Žilinskas J, Kubilius R, Žekonis G, Žekonis J. Total antioxidant capacity of venous blood, blood plasma, and serum of patients with periodontitis, and the

effect of Traumeel S on these characteristics. *Medicina Kaunas* 2011;47:193-9.

208. Zyzak DB, Richardson JM, Thorpe SR, Baynes JW. Formation of reactive intermediates from Amadori compounds under physiological conditions. *Arch Biochem Biophys* 1995;316:547-54.

Anexos

Anexo 1 – Comitê de ética no uso de animais (CEUA).



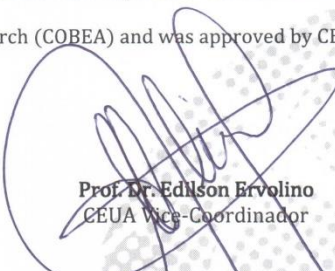
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Influência da infecção pulpar isolada ou associada à diabetes na determinação sérica dos antioxidantes albumina, bilirrubina e ácido úrico e na capacidade antioxidante total" sob responsabilidade do Pesquisador LUCIANO TAVARES ANGELO CINTRA e colaboração de Annelise Katrine Carrara Prieto, Mariane Maffei Azuma, Renata Oliveira Samuel e Aginaldo Cândido da Silva Facundo está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 00582-2012.

CERTIFICATE

We certify that the research "Influence of pulpal infection alone or associated with diabetes in the determination of serum antioxidants albumin, uric acid or bilirrubin and total antioxidant capacity", process number 00582-2012, under responsibility of LUCIANO TAVARES ANGELO CINTRA and with collaboration of Annelise Katrine Carrara Prieto, Mariane Maffei Azuma, Renata Oliveira Samuel and Aginaldo Cândido da Silva Facundo agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.


Prof. Dr. Edilson Ervolino
CEUA Vice-Coordenador

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária - Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal - Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba - SP
Tel (18) 3636-1440 Fax (18) 3636-1403 E-mail: fabianocadioli@fmva.unesp.br

Anexo 2 – Protocolo de mensuração dos antioxidantes endógenos albumina, bilirrubina e ácido úrico.

a-Albumina

A concentração sérica de albumina foi determinada pelo método do verde de bromocresol. Este método baseia-se no desvio do pico de absorvidade máxima de um corante (verde de bromocresol) quando este se liga à albumina (Doumas et al, 1971). No kit comercial vem um reagente único que contém tampão acetato 100 mmol/L, verde de bromocresol 0,27 mmol/L e detergente em um pH 4,1. Lê-se a absorbância (A) do Padrão e da Amostra contra o Branco a 630 nm. A cor é estável durante pelo menos 30 minutos.

A concentração de albumina na amostra calcula-se a partir da seguinte fórmula geral:

$$\frac{A \text{ Amostra}}{A \text{ Padrão}} \times [\] \text{ Padrão} = [\] \text{ Amostra}$$

A solução padrão refere-se a albumina bovina, fornecida pelo kit comercial, reconstituída com água destilada.

b-Ácido Úrico

O ácido úrico foi mensurado pelo método enzimático-colorimétrico (uricase/POD). O ácido úrico é oxidado pela uricase à alantoína e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio na presença da peroxidase reage com 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno (DHBS) e a 4-aminoantipirina, formando o cromogênio antipirilquinonimina. A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração do ácido úrico na amostra.

O ácido úrico é oxidado pela uricase para produzir alantoína e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio reage com 4-aminoantipirina (4-AAP) e sulfonato de 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno (DCHBS) numa reação catalisada por peroxidase para produzir um produto corado.

Reagente único contém fosfatos 100mmol/L, detergente 1,5g/L, diclorofenolsulfonato 4 mmol/L, uricase > 0,12 U/mL, ascorbato oxidase > 5 U/mL,

peroxidase > 1 U/mL, e 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L e pH 7,8. É necessário 200 µl do reagente e 5µl da amostra. O sistema monitoriza a mudança na absorbância a 520 nm com um intervalo de tempo fixo. A mudança na absorbância é diretamente proporcional à concentração de ácido úrico na amostra.

c-Bilirubina

A bilirrubina foi determinada pelo método sulfanílico diazotado. O ácido sulfanílico diazotado transforma a bilirrubina direta em azobilirrubina, que é um complexo que se pode determinar espectrofotométricamente. A cetrimida solubiliza a bilirrubina indireta, permitindo sua reação junto com a fração direta. Os termos “direta” e “indireta” referem-se às características de reação em presença ou ausência de solubilizantes (aceleradores) e equivalem apenas de forma aproximada as frações conjugada e não conjugada.

O espectrofotômetro automático utiliza 200 µl do reagente A (ácido sulfanílico 29 mmol/L, ácido clorídrico 0,2 mol/L, cetrimida 50 mmol/L) homogeneizado com 50 µl do reagente B, (nitrito sódico 11,6 mmol/L) para mensurar uma amostra de 20 µl de soro. Lê-se a absorbância do branco da amostra zerando com água destilada e a amostra zerando com o branco do reagente à 540nm,

Após a leitura no espectrofotômetro com comprimento de onda de 540nm, calcula-se a concentração da bilirrubina pela seguinte fórmula:

$$\frac{A \text{ amostra} - A \text{ branco amostra}}{A \text{ padrão}} \times [\quad] \text{ Padrão} = [\quad] \text{ Concentração da Amostra}$$

A solução padrão refere-se a bilirrubina, fornecida pelo kit comercial, reconstituída com água destilada.

Anexo 3 – Protocolo de mensuração da capacidade antioxidante total (TAC), por meio do método da captura do radical livre ABTS⁺.

Preparação dos reagentes:

Primeiramente elaboraram-se dois reagentes, o reagente 1 (R1) e o reagente 2 (R2). Para originar o R1 necessitou-se de uma solução A e uma solução B, a solução A foi feita com tampão de acetato 0,4 mol/L (pH 5,5), que foi preparado com 16,4004 g de acetato de sódio dissolvidos em quantidade suficiente para (q.s.p.) 500 mL de solução, com água deionizada. Para o preparo da solução B, usou-se 11,4 mL de ácido acético glacial diluído q.s.p. 500 mL de solução, com água deionizada. Um volume de 470 mL da solução A foi misturada com 30 mL da solução B e o pH 5,5 foi posteriormente confirmado.

Para obter o reagente 2 (R2) uma solução tampão de acetato de sódio 30 mmol/L (pH 3,7) denominada solução A foi preparada com 1,2305 g de acetato de sódio dissolvido q.s.p. 500 mL de solução, com água deionizada. Para o preparo da solução B, 0,8530 mL de ácido acético glacial foi diluído q.s.p. 500 mL de solução, com água deionizada. Uma solução C foi preparada misturando 37,5 mL da solução A a 462,5 mL da solução B. Para o preparo da solução D, 140 µL peróxido de hidrogênio a 35% foi diluído q.s.p. 500 mL de solução C, obtendo-se uma concentração final de 2 mmol/L. Em seguida, 1,098 g de ABTS foi dissolvido com 200 mL da solução D (q.s.p.), obtendo-se uma concentração final de 10 mmol/L. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, foi observado a cor verde escuro característica de ABTS⁺⁺.

Curva de calibração:

Uma curva de calibração foi obtida com uso de solução padrão de Trolox (2,0 mmol/L) em diferentes concentrações (0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 mmol/L). Aliquotas de 20 µL de cada solução padrão Trolox foram acrescidas a 800 µL do R1. Após 3 minutos de estabilização, foram adicionados 80 µL do R2. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorbância utilizando-se 620 nm de comprimento de onda. A partir dos valores obtidos das absorbâncias das diferentes concentrações de padrão Trolox foi criada uma curva de reação utilizada para obter o valor de TAC expresso em mmol Trolox equivalente/L.

Procedimento:

Para leitura das amostras, 5 μ L de amostra foram adicionados a 200 μ L do R1, aguardou-se 3 minutos para a estabilização e depois se acrescentou 20 μ L do R2, aguardou-se 5 minutos e realizou-se a leitura em espectrofotômetro, utilizando-se 620 nm de comprimento de onda.

Os valores de absorbância obtido das amostras foram transferidos para a curva padrão de trolox para obter os resultados em mmol Trolox equivalente/L.

Anexo 3 – Determinação do MDA pelo método TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

Anexo 4 – Protocolo de mensuração do malonaldeído (MDA), por meio do ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Preparo das soluções:

Foram preparadas previamente as soluções de ácido tricloacético (TCA) 35% e 70%, para isto pesou-se 35g e 70g de TCA, e diluiu-se cada pesagem de soluto em 100 ml de água destilada (q.s.p.) separadamente, obtendo dessa forma as duas soluções.

Para a preparação do tampão de Tris 50 mM foi utilizado 0,6055g do tris (hidroximetil) aminometano em 90ml de água (q.s.p.), ajustou-se o pH com solução de ácido clorídrico até 7,4 e acrescentou-se 10ml de água.

A solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,75%, foi preparada dissolvendo-se 28,4g de Na₂SO₄ em 100ml de água (q.s.p.) e acrescentando-se 0,74g de TBA na solução de Na₂SO₄ 2 M.

Curva de calibração:

Para fazer o padrão malonaldeído (MDA), foi utilizado 100 μ L de MDA puro (96%) em um balão de 1000 ml, completando com água destilada, assim foi obtida a solução estoque de 400 μ M. Uma curva de calibração foi obtida com uso de solução padrão de MDA (400 μ M) diluído em água destilada em diferentes concentrações (5, 10, 25, 50 e 100 μ M).

Procedimento:

Em um criotubo pipetou-se 125 μ L da amostra e acrescentou-se 125 μ L de TCA 35%, o qual foi colocado em um vortex. Logo após, acrescentou-se 125 μ L do tampão de Tris e foi vortexado. Incubou-se por 10 min em temperatura ambiente, para depois

agregar 250 μL da solução de TBA, tampou-se o criotubo e colocou-se no vortex. Realizou-se uma incubação por 45 min em 100°C , terminado o tempo, incubou-se por mais 10min na água em temperatura ambiente. Terminada a incubação acrescentou-se 250 μL de TCA 70% e vortexou-se, seguida de uma centrifugação em 4000 rpm por 10 min, em seguida, pipetou-se 150 μL do sobrenadante na placa de 96 poços, e realizou-se a leitura 545 nm de comprimento de onda na leitora de ELISA. Obtido os valores de absorbância, eles foram transferidos para a curva padrão de MDA para obtenção das concentrações em m/mol.