



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Júlio de Mesquita Filho"

*Carolina de Barros Moraes Cardoso*

## **TESE DE DOUTORADO**

Relação da Periodontite apical com a Artrite  
Reumatóide. Estudo em tecido hematológico, lesões  
periapicais e articulações femorotibiais

**ARAÇATUBA-SP**

2023



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"Júlio de Mesquita Filho"**

*Carolina de Barros Moraes Cardoso*

## **TESE DE DOUTORADO**

Relação da Periodontite apical com a Artrite  
Reumatoide. Estudo em tecido hematológico, lesões  
periapicais e articulações femorotibiais

Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Araçatuba, Universidade  
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" -  
UNESP como parte dos requisitos para obtenção  
do título de Doutora em Ciência Odontológica,  
área de concentração em Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Tavares  
Ângelo Cintra.

**ARAÇATUBA-SP**

2023

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

C268r

Cardoso, Carolina de Barros Moraes.

Relação da periodontite apical com a artrite reumatoide : estudo em tecido hematológico, lesões periapicais e articulações femorotibiais / Carolina de Barros Moraes Cardoso. - Araçatuba, 2023

52 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Luciano Tavares Ângelo Cintra

1. Periodontite periapical 2. Artrite reumatoide 3. Endodontia I. T.

Black D24  
CDD 617.67

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

# *Dedicatória*

## **Dedico este trabalho aos meus pais,**

**Elizabete de Barros Moraes Cardoso e Estefani Cardoso**, que têm me guiado ao longo da vida. Graças a vocês me tornei a mulher que sou hoje, da qual me orgulho muito. Sem vocês apoiando todos os meus sonhos, a conclusão de um Doutorado jamais seria possível. Obrigada por me guiarem sempre no caminho do bem e por continuarem cuidando de mim (embora isso já não seja mais tão necessário). Tenho muita sorte por ter pais tão presentes e amorosos como vocês. Espero, um dia, poder retribuir um pouco do que foi sempre feito por mim. Amo vocês mais que tudo e, no momento de hoje, não consigo imaginar a vida sem vocês aqui.

# Agradecimientos

## **Agradecimentos Especiais**

À **Deus**, pelo dom da vida e por estar sempre presente. Confiar em Teus planos é o que me faz vencer as adversidades e estar em paz.

Ao meu irmão **Estefani**, por todo apoio e por ser a minha maior e melhor ponte com o passado. Obrigada por tudo o que já vivemos juntos e pelo maior presente que ganhei na vida: **Aurora**. Minha princesa, você ainda é tão pequena e não tem ideia do quão incrível é ser sua tia. Te ver crescer e descobrir um mundo é o que tem me motivado cada vez mais. Estarei sempre aqui para vocês!

Aos nossos filhos caninos **Chanel, Thor, Elvis e Brownie**. Obrigada por sempre me proporcionarem um amor tão puro que palavra alguma poderia descrever. Nossa família estaria incompleta sem vocês!

## **Agradecimentos aos Professores**

Agradeço ao meu orientador **Profº Luciano Tavares Angelo Cintra** pela oportunidade, suporte e paciência. São nove anos sob seu apurado olhar e já não me lembro como a vida era sem a sua mentoria. Obrigada por ser um exemplo de profissional para nós. Sua dedicação, determinação, inteligência e serenidade nos inspiram e nos fazem acreditar que, um dia, talvez também possamos chegar lá. Meu caminho não poderia ter cruzado com o de outro orientador, professor. Gratidão eterna POR TUDO. Graças ao senhor, tive oportunidades incríveis.

Ao **Profº João Eduardo Gomes-Filho**, por aceitar o convite para compor a banca examinadora de Defesa de Doutorado. Sem dúvidas o senhor terá muito a contribuir com nosso trabalho, professor. Além disso, deixo registrado aqui todo o meu carinho e gratidão à sua pessoa. Sempre tão calmo, tão pacífico, tão humano. Com certeza todos que te conhecem sabem a sorte que têm. Obrigada por ser inspiração para todos nós.

Ao professor **Alvaro Cruz González**, por aceitar prontamente nosso convite para compor a banca examinadora de Defesa de Doutorado, mesmo sem me conhecer. É uma honra tê-lo conosco no dia de hoje. Muito obrigada! *Al maestro Alvaro Cruz González, por aceptar nuestra invitación para hacer parte de la comisión examinadora de mi Defensa de Tesis, mismo sin conocerme. Es un honor tenerlo junto a nosotros hoy. Muchísimas gracias!*

À **Profª Renata Samuel** por aceitar prontamente o convite para compor a banca de Defesa de Doutorado. Além disso, nos conhecemos desde quando entrei na IC, sendo também minha banca de TC. Você é exemplo de profissional e pessoa. A sua trajetória inspira muitas mulheres como eu! É uma honra tê-la no momento de encerramento deste ciclo. Obrigada Profª Renata.

Ao **Profº Leopoldo Cosme Silva**, por também compor a banca examinadora de Defesa de Doutorado. Obrigada por tão prontamente aceitar meu convite e por todas as considerações que sei que fará. Você, diferente dos outros professores, há pouco tempo estive nesse mesmo lugar que estou agora e juntos compartilhamos muitos momentos,



risadas e trabalhos. Só tenho a agradecer por estar presente no momento de hoje e pela inspiração que é!

Ao **Profº Rogério de Castilho Jacinto**, que compôs a banca do Exame Geral de Qualificação e fez considerações pertinentes a respeito do trabalho. Todas foram acatadas e o agradeço muito, professor. Agradeço também por aceitar o convite para ser membro suplente no dia de hoje. Me parece nostálgico recordar que a primeira turma para quem o senhor deu aula aqui na FOA foi a minha, no ano em que eu estava sendo introduzida ao mundo da Endodontia. Obrigada pelos ensinamentos desde aquela época e pela boa convivência.

À **Profª Francine Benetti** que aceitou prontamente o convite para ser membro suplente da banca examinadora de Defesa de Doutorado. Fizemos uma parte da pós-graduação juntas e sempre foi um exemplo de determinação, foco, generosidade e garra para todos nós, pós-graduandos. Suas sugestões sempre são pertinentes e tenho certeza de que é capaz de agregar muito ao nosso trabalho. Muito obrigada pela disponibilidade, Profª Fran.

À **Profª Suely Regina Mogami Bonfim**, professora de Hematologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, por abrir as portas de seu laboratório para que as análises do hemograma pudessem ter sido realizadas pelo aluno de Doutorado **Murilo**. Aliás, agradecimento especial à ele também, que esteve presente nos dias de experimento e à médica veterinária **Gabriela Galo**, responsável pelas injeções para a indução de artrite reumatoide nos animais. Meninos, muito obrigada! Vocês não imaginam como ajudaram! Além disso, agradeço também à Professora que aceitou prontamente e com muita felicidade o convite de ser membro suplente no dia de hoje.

Ao **Profº Gustavo Sivieri de Araújo**, que compôs a banca do Exame Geral de Qualificação e contribuiu muito com a melhoria do trabalho. Além disso, agradeço a boa convivência, amizade, aprendizado e por sempre ser tão acessível aos alunos. O senhor é uma pessoa muito querida por mim!

Ao **Profº Elói Dezan Júnior** por todos os ensinamentos compartilhados, atenção, boa convivência e por ser um grande exemplo dentro da Endodontia.

Ao **Profº Juan José Segura-Egea**, por ter aceitado me receber durante um ano na Universidade de Sevilla para a realização do meu Doutorado Sanduíche. Sem o seu aceite, a realização deste sonho não seria possível. Muito obrigada, professor! *Al profesor Juan José Segura-Egea, por aceptarme durante un año en la Universidad de Sevilla para realizar mi Doctorado Sandwich. Sin su aceptación, la realización de este sueño no sería posible. ¡Muchas gracias Maestro!*

À **Profª e Pesquisadora Áurea Simon Soro**, que abriu as portas de seu laboratório na Universidade de Sevilla para receber-me. Além disso, fez o possível para que eu tivesse uma boa experiência e me sentisse confortável ali. Obrigada por me introduzir ao mundo da Microbiologia e por todos os ensinamentos, Aurea! Conviver com você e suas filhas (Clara e Lola) durante este tempo foi um dos pontos altos da experiência. Sempre as levarei no coração! *A la Profesora y Investigadora Áurea Simon Soro, que me abrió las puertas de su laboratorio en la Universidad de Sevilla para recibirme. Además, se aseguró de que tuviera una buena experiencia y que me sintiera cómoda allí. ¡Gracias por introducirme en el mundo de la Microbiología y por todas las enseñanzas, Aurea! Vivir con usted y sus hijas (Clara y Lola) durante este tiempo fue uno de los aspectos más bonitos de la experiencia. ¡Siempre las llevaré en mi corazón!*

A **todos os professores da FOA-UNESP** que fizeram parte do meu aprendizado e se tornaram grandes inspirações para mim.

## **Agradecimentos aos funcionários**

Aos **Jorge e Carlos** por toda boa convivência e boa vontade durante estes anos. No decorrer deles, pude perceber quão do bem vocês são.

Aos funcionários da FOA do Centro, **Andressa e Márcio**, por serem as primeiras pessoas que eu via todos os dias e por me receberem sempre com um “bom dia”. Vocês fizeram jus à frase “um bom dia pode melhorar o dia de alguém”. Obrigada por melhorarem os meus dias todos os dias.

Ao funcionário do Biotério Central, **João Batista**, pela paciência, generosidade e por ter me fornecido os animais que precisei para a execução deste trabalho.

## **Ao modelo de Estudo**

Aos animais utilizados, essenciais para o desenvolvimento deste projeto.

## **Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**

Pela concessão da bolsa que foi fundamental para minha manutenção na pós-graduação, além dos recursos oferecidos para o desenvolvimento do projeto (Processo 140260/2020-0).

## **À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## **Aos amigos**

À minha amiga e inspiração, **Mariane Maffei Azuma**. Minha primeira orientadora e chefe, só tenho a te agradecer por tudo. Graças a você iniciei no mundo acadêmico e aqui

fui muito feliz! Não poderia ter tido uma tutora melhor do que você. Gratidão eterna, Mari!

Às minhas amigas de graduação que se mantêm em minha vida até hoje. **Lara Cunha Cervantes** com quem compartilhei apartamento nos primeiros anos de Doutorado. **Letícia Cabrera Capalbo**, de quem fui madrinha de casamento. E **Bruna Egumi Nagay**, que mesmo com a distância entre nós sempre se faz presente. Sem dúvidas a FOA me presenteou preciosamente com vocês quando nos encontramos há onze anos. Obrigada pela amizade, meninas! Que sempre estejamos presentes nos momentos importantes da vida uma da outra!

Aos que me ajudaram diretamente na execução deste trabalho: **Cristiane Cantiga da Silva, Flavio Duarte Faria, Mariana Pagliusi Justo e Carolina Wajima**. Meus queridos, muito obrigada por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por toda boa vontade, empenho e por estarem presentes em todos os experimentos. Este resultado não seria possível sem a dedicação de vocês também. Além disso, obrigada pela amizade fora das dependências da faculdade e por toda a troca de afeto!

Aos meus amigos de pós-graduação **Amanda Caselato Andolfatto, Heitor Ceolin Araújo, Pedro Henrique Chaves, Renan Dal Fabbro**, agradeço a amizade ao longo dos anos e por todos os momentos vividos até aqui. Sem dúvidas a presença de vocês tornou o processo mais leve e prazeroso. Hoje em dia, vocês são meus amigos, independente de trabalho ou não e tenho certeza de que continuarão o sendo por toda a vida!

*"Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano. Sempre que alguém descobre esse poder, algo antes considerado impossível se torna realidade." Albert Einstein*

CARDOSO, CBM. **Relação da Periodontite apical com a Artrite Reumatoide. Estudo em tecido hematológico, lesões periapicais e articulações femorotibiais**, 2023. Tese (Doutorado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação da periodontite apical (PA) com a artrite reumatóide (AR), por meio do estudo em tecido hematológico, lesões periapicais e articulações femorotibiais. Foram utilizados 40 ratos *Wistar* divididos em 4 grupos (n=10): controle (C), PA (PA), AR (AR), PA e AR (PA+AR). A indução da AR foi realizada com duas injeções subcutâneas caudais (dias 0 e 7) contendo 50µL de albumina bovina metilada (Met-BSA, 40 mg/mL) e glicose 5% emulsificada com CFA/adjuvante completo de Freund (*Mycobacterium sp*) e uma injeção intra-articular no joelho direito (dia 14) da mesma solução com volume de 25µL. A largura dos joelhos foi mensurada durante todo o período experimental. A exposição pulpar para indução da PA foi realizada 2 dias após a primeira injeção caudal, por meio de exposição pulpar dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito. Após mais 28 dias os animais foram anestesiados e o sangue coletado por punção cardíaca para análise do hemograma. Em seguida, os animais foram eutanasiados e as hemimandíbulas e as articulações femorotibiais foram coletadas. As hemimandíbulas foram processadas e coradas com hematoxilina & eosina (H&E) para análise do processo inflamatório e reabsortivo; e coradas com picrosirius red (PSR) para avaliação da maturação colágena. As articulações foram processadas e coradas em H&E para análise histológica; e coradas com PSR e Tricrômico de Masson (TM) para verificação da maturação colágena. Testes estatísticos foram aplicados ( $p<0,05$ ). Os grupos AR e PA+AR, apresentaram maior largura do joelho a partir do 7º dia de experimento, comparados aos grupos C e PA ( $p<0,05$ ). No eritrograma foi observado aumento no volume corpuscular médio (VCM) no grupo PA+AR, em relação aos grupos C e PA ( $<0,05$ ). No leucograma foi observado aumento no número de leucócitos totais e linfócitos nos grupos PA, AR e PA+AR, comparados ao controle ( $p<0,05$ ). Ainda, observou-se que os grupos PA e PA+AR apresentaram aumento superior ao grupo AR ( $p<0,05$ ). A análise das articulações demonstrou características compatíveis com as da artrite nos grupos AR e PA+AR. Ainda o grupo PA+AR apresentou maior quantidade de fibras colágenas imaturas quando comparado ao grupo AR ( $p<0,05$ ). A análise histológica das lesões periapicais demonstrou que o grupo

PA+AR apresentou infiltrado inflamatório mais intenso, maior reabsorção óssea e maior quantidade de fibras colágenas imaturas quando comparado ao grupo PA ( $p<0,05$ ). Desta forma, conclui-se ser positiva a relação entre a PA e a AR, onde a associação PA+AR interferiu em parâmetros sanguíneos do hemograma, no perfil inflamatório e reabsortivo de lesões periapicais, bem como no processo de maturação colágena em leões periapicais e nas articulações femorotibiais.

**Palavras-chave:** Periodontite Apical. Artrite Reumatoide. Infecção Endodôntica.

CARDOSO, CBM. **Relationship of apical periodontitis with rheumatoid arthritis. Study in hematological tissue, periapical lesions and femorotibial joints**, 2023. Thesis (Doctorate in Endodontics) – Faculty of Dentistry of Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the relationship between apical periodontitis (AP) and rheumatoid arthritis (RA), through the study of hematological tissue, periapical lesions and femorotibial joints. Forty Wistar rats were divided into 4 groups (n=10): control (C), PA (PA), AR (AR), PA and AR (PA+AR). RA induction was performed with two caudal subcutaneous injections (days 0 and 7) containing 50µL of methylated bovine albumin (Met-BSA, 40 mg/mL) and 5% glucose emulsified with CFA/complete Freund's adjuvant (*Mycobacterium* sp) and an intra-articular injection in the right knee (day 14) of the same solution with a volume of 25µL. The width of the knees was measured throughout the experimental period. AP was induced 2 days after the first caudal injection, by means of pulpal exposure of the upper and lower first and second molars on the right side. After another 28 days, the animals were anesthetized and blood was collected by cardiac puncture for hemogram analysis. Then, the animals were euthanized and the hemimandibles and femorotibial joints were collected. The hemimandibles were processed and stained with hematoxylin & eosin (H&E) for analysis of the inflammatory and resorptive process; and stained with picosirius red (PSR) to assess collagen maturation. Joints were processed and stained in H&E for histological analysis; and stained with PSR and Masson's Trichrome (TM) to verify collagen maturation. Statistical tests were applied ( $p<0.05$ ). The AR and PA+AR groups showed greater knee width from the 7th day of the experiment onwards, compared to the C and PA groups ( $p<0.05$ ). In the erythrogram, an increase in the mean corpuscular volume (MCV) was observed in the PA+AR group, in relation to the C and PA groups ( $<0.05$ ). In the leukogram, an increase in the number of total leukocytes and lymphocytes was observed in the PA, AR and PA+AR groups, compared to the control ( $p<0.05$ ). Furthermore, it was observed that the PA and PA+AR groups showed a higher increase than the AR group ( $p<0.05$ ). Joint analysis showed characteristics compatible with those of arthritis in the RA and PA+RA groups. The PA+AR group also showed a higher amount of immature collagen fibers when compared to the AR group ( $p<0.05$ ). Histological analysis of the periapical lesions showed that the PA+RA group had a more intense inflammatory infiltrate, greater bone



resorption and a greater amount of immature collagen fibers when compared to the PA group ( $p < 0.05$ ). Thus, it is concluded that the relationship between PA and RA is positive, where the association PA+AR interfered in blood parameters of the blood count, in the inflammatory and resorptive profile of periapical lesions, as well as in the process of collagen maturation in periapical lesions and in the femorotibial joints.

**Keywords:** Apical Periodontitis. Rheumatoid arthritis. Endodontic Infection.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <b>Páginas</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| <b>FIGURA 1</b> – Ilustração das etapas de indução da AR. Injeção subcutânea caudal (dias 0 e 7) e injeção intra-articular no joelho direito (dia 14).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 26             |
| <b>FIGURA 2</b> – Cronologia das etapas experimentais.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 27             |
| <b>FIGURA 3</b> – Imagens representativas das mensurações das articulações femorotibiais dos grupos Controle (C) e AR (AR) empregando paquímetro digital, realizadas no período de 30 dias.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 30             |
| <b>FIGURA 4</b> – Fotomicrografias representativas das articulações femorotibiais no período de 30 dias. A coloração de H&E (a-d e a1-d1) nos grupos C (a, a1) e PA (b,b1) mostrou a região da articulação com ausência de infiltrado inflamatório; Os grupos AR (c, c1) e PA+AR (d, d1) denotando exacerbado infiltrado inflamatório na região articular com predominância de células mononucleares, espessamento do tendão e de vasos sanguíneos. A coloração de TM (e-h, e1-h1 e e2-h2) nos grupos C (e, e1) e PA (f, f1) apresentaram integridade das fibras colágenas e organização tecidual; Os grupos PA (g, g1) e PA+AR (h, h1) apresentaram exacerbada quantidade de tecido colagenoso (azul) e de vasos sanguíneos (vermelho). A coloração de PSR (i-l) nos grupos C (i) e PA (j) demonstrou a integridade das fibras colágenas com maior porcentagem de fibras maduras; Os grupos PA (k) e PA+AR (l) demonstrando maior quantidade significativa de fibras colágenas imaturas na região periapical. [H&E: a-d 50x, a1-d1 100x; TM: e-h 25x, e1-h2 100x; PSR: i-l 400x]. | 33             |
| <b>FIGURA 5</b> – Fotomicrografia da região periapical no período de 30 dias. A coloração de H&E (a-d) nos grupos C (a, a1) e AR (b,b1) apresentou região apical com ausência de infiltrado inflamatório e reabsorção óssea; O grupo PA (c, c1) apresentou moderado infiltrado inflamatório em torno do ápice                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 36             |

radicular, desorganização do ligamento periodontal e área de reabsorção óssea; O grupo PA+AR (d, d1) apresentou intenso infiltrado inflamatório, bem como extensa área de reabsorção óssea periapical, reabsorções cementária e dentinária, além de desorganização do ligamento periodontal. A coloração de PSR nos grupos C (e) e AR (f) evidenciou integridade das fibras colágenas com maior porcentagem de fibras maduras; Os grupos PA (g) e PA+AR (h) demonstraram maior quantidade de fibras colágenas imaturas na região periapical. [H&E: a-d 50x, a1-d1 100x; PSR: e-h 400x].

## LISTA DE TABELAS

### *Páginas*

**TABELA 1** – Média e desvio padrão, em milímetros, das medidas da articulação femorotibial direita dos animais dos quatro grupos experimentais de acordo com o período de mensuração. 31

**TABELA 2** – Média e Desvio Padrão dos parâmetros sanguíneos de todos os grupos experimentais. 31

**TABELA 3** – Média e desvio padrão da porcentagem de fibras colágenas imaturas (verdes) e maduras (vermelhas) na articulação femorotibial nos quatro grupos experimentais. 34

**TABELA 4** – Escores, Mediana, Média, Desvio Padrão (DP) das análises histológica e histométrica. 37

**TABELA 5** – Média e desvio padrão da % de fibras colágenas maduras e imaturas na região periapical dos grupos experimentais. 37

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                                                             | <i>Páginas</i> |
|-------------------------------------------------------------|----------------|
| ACPA – Anticorpos Contra Proteínas e Peptídeos Citrulinados | 23             |
| AR – Artrite Reumatoide                                     | 23             |
| CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais                  | 25             |
| CHCM – Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média        | 28             |
| DP – Desvio Padrão                                          | 22             |
| DP – Doença Periodontal                                     | 24             |
| EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético                   | 27             |
| FR – Fator Reumatoide                                       | 23             |
| He – Hemácias                                               | 28             |
| Hb – Hemoglobina                                            | 28             |
| H&E – Hematoxilina & Eosina                                 | 28             |
| IgG – Imunoglobulina do tipo G                              | 23             |
| IL-1 – Interleucina-1                                       | 23             |
| IL-6 – Interleucina-6                                       | 23             |
| IL-17 – Interleucina-17                                     | 23             |
| Met-BSA – Albumina Bovina Metilada                          | 26             |
| NF-kB – Fator Nuclear Kappa B                               | 42             |
| PA – Periodontite Apical                                    | 23             |
| PSR – Picrosirius Red                                       | 28             |
| PVPI – Iodopovidona                                         | 26             |

|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| TM – Tricrômico de Masson                     | 28 |
| TNF- $\alpha$ – Fator de Necrose Tumoral Alfa | 23 |
| VCM – Volume Corpuscular Médio                | 31 |
| VG – Volume Globular                          | 28 |

## SUMÁRIO

## *Páginas*

|    |                                                          |    |
|----|----------------------------------------------------------|----|
| 1  | INTRODUÇÃO                                               | 23 |
| 2  | OBJETIVOS                                                | 25 |
| 3  | MATERIAL E MÉTODOS                                       | 25 |
| 4  | FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS                          | 28 |
| 5  | RESULTADOS                                               | 30 |
| 6  | DISCUSSÃO                                                | 38 |
| 7  | CONCLUSÃO                                                | 43 |
| 8  | REFERÊNCIAS                                              | 44 |
| 9  | SUPORTE FINANCEIRO                                       | 51 |
| 10 | ANEXO (Certificado do Comitê de Ética no uso de animais) | 52 |

## 1. Introdução e Justificativa

Segundo o Colégio Americano de Reumatologia (2021), a artrite reumatoide (AR) é o tipo mais comum de artrite autoimune, afetando mais de 1,3 milhão de norte-americanos, sendo 75% deste grupo composto por mulheres. Além disso, estima-se que 1 a 3% das mulheres de todo o mundo podem ter AR por volta dos 30 a 50 anos de idade (Karataş et al. 2020). Essa doença é caracterizada pela produção de diversos auto-anticorpos, incluindo o fator reumatoide (FR) e anticorpos contra proteínas e peptídeos citrulinados (ACPA), sendo a destruição articular sua principal lesão (Brink et al. 2016). A Sociedade Brasileira de Reumatologia (2020) afirma que sua causa ainda é desconhecida, podendo apresentar alguns fatores de risco como, por exemplo, fatores genéticos, tabagismo, fatores ambientais e gênero (Little et al. 2013).

A artrite leva a sinovite, infiltração celular e a um processo desorganizado de destruição e remodelação óssea, resultante da ação de células T e B autorreativas, que envolvem várias cascatas inflamatórias (Firestein et al. 2003), principalmente com uma superprodução e superexpressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e da interleucina 6 (IL-6) (Gierut et al. 2010). A membrana sinovial é a principal fonte de citocinas pró-inflamatórias e proteases e, em conjunto com osteoclastos e condrócitos, promove a destruição articular, formando o pannus, uma camada anormal de tecido de granulação composta por células do sistema imunológico, vasos sanguíneos e células fibrosas (Little et al. 2013). O pannus começa a crescer a partir da membrana sinovial e acaba invadindo a articulação na AR, causando destruição irreversível da cartilagem e erosão óssea (Tanaka et al. 2014). Com relação à cascata inflamatória, a presença de agregados de imunoglobulina do tipo G (IgG) ou de complexos de IgG-FR (fator reumatoide) ativa o sistema complemento e resulta em diversos fenômenos inflamatórios (Clavel et al. 2008). Além disso, o reconhecimento dos complexos imunes por fagócitos promove liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$  e IL-6, o que exacerba ainda mais o processo inflamatório (Alessandri et al. 2008).

A AR foi a primeira doença sistêmica relacionada com infecções orais na época da teoria da infecção focal proposta por Billings em 1912. Essa teoria postulava que dentes infectados poderiam ser os causadores de doenças sistêmicas e que microrganismos se disseminariam de uma área isolada para outras áreas do corpo. Apesar desta teoria ter sido desacreditada, sabemos que a infecção endodôntica pode influenciar a condição sistêmica por meio de três formas principais: (I) a partir do desenvolvimento de um abscesso periapical agudo onde os microrganismos e seus produtos podem se



disseminar; (II) a partir de um procedimento endodôntico, em que os microrganismos são disseminados via sistema circulatório; (III) e a partir de uma lesão inflamatória periapical crônica, pela liberação contínua de produtos bacterianos e mediadores inflamatórios (Cintra et al. 2021).

Na época da teoria da infecção focal e a partir dos estudos de Mayo em 1914, a AR foi fortemente relacionada à saúde oral comprometida, onde se especulava que o abscesso periapical poderia originar um reumatismo crônico (hipótese nunca comprovada) (Mayo 1914). Algumas associações destas enfermidades foram publicadas como o estudo de Cecil e colabs. com 200 casos de reumatismo, onde 62% estavam relacionados à microbiota oral (Cecil et al. 1927). Além disso, foi verificado que o *Streptococcus ssp.*, muito prevalente na cavidade oral, era o agente primário nos casos de reumatismo (Shandalow et al. 1928).

Estudos clínicos e em animais demonstraram relação de associação, mas não causal, entre a doença periodontal (DP) e a AR. Foi observado maior perda óssea e ausência dentária em pacientes portadores da AR quando comparados à pacientes controle (Renvert et al. 2020). Em animais, foi observado maior infiltrado inflamatório celular nas articulações de ratos com DP e AR, quando comparados aos animais com as patologias isoladas (Sakaguchi et al. 2019). Essa provável relação se fortalece, uma vez que, tanto a DP quanto a AR apresentam os mesmos fatores de risco, como por exemplo, o tabagismo, diabetes, doenças cardiovasculares, stress, idade e o próprio biofilme periodontal (Samborska-Mazur et al. 2020). Já em relação à PA, um único estudo recente demonstrou que pacientes com AR possuem maior incidência de lesões periapicais de origem endodôntica (Karataş et al. 2020).

Sabe-se também que a DP e a PA possuem vias biológicas semelhantes e os estudos recentes da medicina periodontal e da medicina endodôntica vem acrescentando dados importantes ao conhecimento científico (Cintra et al. 2018, 2021).

A influência da PA na saúde sistêmica tem sido alvo de intensos estudos de nosso grupo de pesquisa (Cintra et al. 2013a, 2013b, 2014a, 2014b, 2014c, 2016, 2017a, 2018, 2021; Astolphi et al. 2013, 2015; Azuma et al. 2017; Ferreira et al. 2017; Conti et al. 2020; Cantiga-Silva et al. 2021). Empregando modelo animal padronizado, verificamos que a PA, quando associada à diabetes mellitus (DM) e à DP pode influenciar os níveis de triglicérides (Cintra et al. 2013a), creatinina (Cintra et al. 2013b), hemoglobina glicada (Cintra et al. 2014c), plaquetas (Ferreira et al. 2017), mediadores pró-inflamatórios (Cintra et al. 2014b), peso corporal (Cintra et al. 2017a), peso de órgãos (Cintra et al.

2017a), marcadores inflamatórios em órgãos (Azuma et al. 2017), além de alterar alguns parâmetros do hemograma, destacando-se a série branca (Cintra et al. 2014a), bem como é capaz de alterar o sinal insulínico do sangue e do tecido muscular (Astolphi et al. 2013, 2015; Pereira et al. 2016). Ainda, verificamos que determinadas alterações sistêmicas podem elevar a atividade osteoclástica nas lesões periapicais (Gomes-Filho et al. 2015, Martins et al. 2016). Analisando a PA de forma isolada, verificamos que o seu impacto sobre a saúde sistêmica é proporcional ao número de dentes com infecção (Cintra et al. 2016, Samuel et al. 2018, Azuma et al. 2018, 2021), o que aumenta a preocupação com lesões periapicais crônicas não tratadas.

Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi o de padronizar o modelo da artrite reumatoide em ratos Wistar e verificara possível relação bidirecional entre essa enfermidade sistêmica e a periodontite apical.

## **2. Objetivo Geral**

O objetivo do presente estudo foi analisar a influência da artrite reumatoide nos parâmetros sanguíneos do hemograma, bem como no processo inflamatório, reabsortivo e maturativo de fibras colágenas da periodontite apical.

## **3. Material e Métodos**

### **3.1 – Animais**

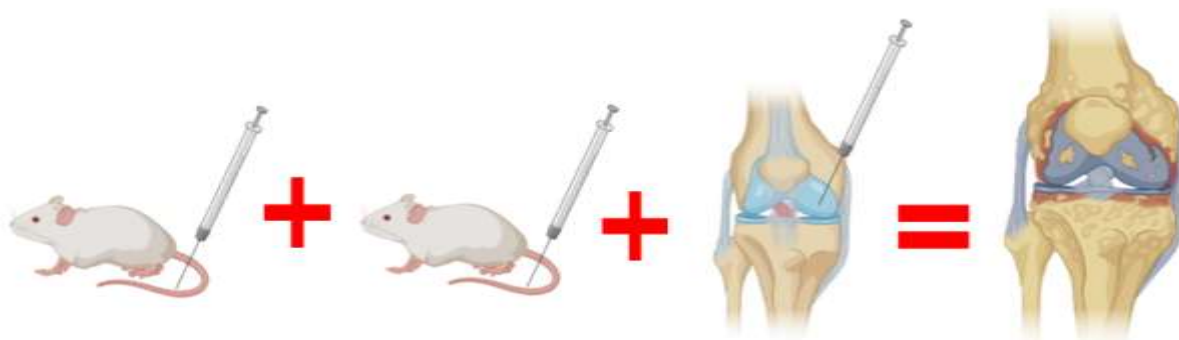
Este trabalho foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA nº n° 0640-2021) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, e durante todo o experimento os animais foram tratados de acordo com os padrões éticos, visando o bem-estar animal.

Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), com aproximadamente 5 meses, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP. Os animais foram mantidos em mini-isoladores (Alesco- Monte Mor, São Paulo, Brasil) com temperatura entre 22 e 24°C com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas, quatro ratos por gaiola, alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água “ad libitum”, exceto nas primeiras 24 horas após intervenção.

### **3.2 – Procedimentos Experimentais**

#### **3.2.1 – Indução da Artrite Reumatoide**

A indução da AR foi realizada em metade dos animais por meio de três injeções (Figura 1). As duas primeiras injeções foram subcutâneas caudais, realizadas nos dias 0 e 7 e contendo um volume de 50µL de albumina bovina metilada (Met-BSA, 40 mg/mL, Sigma - Aldrich) e glicose 5% emulsificada com CFA/adjuvante completo de Freund (*Mycobacterium* sp, Santa Cruz Biotechnology). A terceira injeção realizada foi intra-articular no joelho direito, no dia 14, com a mesma solução descrita anteriormente em um volume de 25µL (Oliveira et al. 2018). Para a terceira injeção, os animais foram anestesiados utilizando-se uma associação do sedativo Xilazina 2% (relaxante muscular, analgésico e sedativo, Xilazin, Syntec do Brasil LTDA – Cotia, São Paulo, Brasil – 10mg/kg), e o anestésico Cloridrato de Cetamina 10% (Ketamina Agenor 10%, União Química Farmacêutica Nacional S/A – Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil – 80mg/kg). Após a anestesia, foi realizada a tricotomia na região articular do joelho direito e assepsia com iodopovidona (PVPI) para posterior injeção.



**Figura 1.** Ilustração das etapas de indução da AR. Injeção subcutânea caudal (dias 0 e 7) e injeção intra-articular no joelho direito (dia 14) (Fonte [www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

### 3.2.2 – Indução da Periodontite Apical

Após 2 dias da primeira injeção para indução da AR (dia 2), os 20 ratos dos grupos PA e PA+AR foram anestesiados com o protocolo descrito no item 3.2.1. As polpas dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito foram expostas, por meio de uma broca em aço carbono (Broca Ln Long Neck- Maillefer, Dentsply) dotada de uma esfera na extremidade com 0,5mm de diâmetro (Cintra et al. 2014a, 2016). Desta forma, todas as exposições pulpares foram padronizadas e as polpas expostas na cavidade bucal por um período de 28 dias (dia 30), momento da eutanásia.

### 3.2.3 – Formação dos grupos e Linha do tempo experimental

Após os procedimentos de indução da AR e PA, os 40 animais em estudo formaram quatro grupos experimentais, contendo 10 animais cada grupo, assim compostos:

- Grupo C: ratos controle;
- Grupo PA: ratos com PA;
- Grupo AR: ratos com AR;
- Grupo PA+AR: ratos com PA e AR.

Considerando os tempos de cada tipo de intervenção até o final do experimento foi construído a seguinte linha do tempo (Figura 2):



**Figura 2.** Cronologia das etapas experimentais.

### 3.2.4 – Controle do inchaço nos joelhos

A largura das articulações femurotibiais foi monitorada durante todo o experimento com auxílio de paquímetro digital, sendo as mensurações realizadas nos dias 02, 07, 14, 21 e 30 do experimento. As mensurações foram realizadas no sentido médio-lateral do joelho direito de todos os animais.

### 3.2.5 – Eutanásia e Processamento laboratorial

Após 28 dias de desenvolvimento da periodontite apical, os animais foram anestesiados e amostras de 7ml de sangue foram coletadas por punção cardíaca para análise hematológica.

Após a coleta sanguínea, os animais foram eutanasiados e as mandíbulas e articulações femorotibiais foram removidas e fixadas em solução formalina a 10% por 20 horas. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 12 horas e submetidas ao processo de desmineralização em solução de EDTA (Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri) pelo período aproximado de 3 meses. Após a desmineralização, as peças foram lavadas em água corrente por 12 horas, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em

parafina (Histosec, Merck S/A, São Paulo, SP, Brasil). A partir dos blocos de parafina, cortes teciduais com espessura de 5µm foram obtidos em micrótomo (RM 2045, Leica do Brasil Importação e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Lâminas histológicas com 3 cortes teciduais das hemimandíbulas foram montadas e coradas para Hematoxilina & Eosina (H&E) e Picrosirius Red (PSR). Já as articulações femurotibiais, além dessas duas colorações, também foram preparadas lâminas histológicas para a coloração de Tricrômico de Masson (TM).

#### **4- Forma de análise dos resultados**

##### **4.1- Análise do Hemograma**

Para a realização do hemograma foi utilizado o analisador automático ABX (ABX Micros ABC Vet - Horiba ABX Diagnostics, Montpellier, France) e o kit ABX VetPack composto por 3 reagentes. O ABX VET Pack, R3 é uma solução salina e tampão eletrolítica que permite a diluição e a preparação da amostra de sangue para análise. A presença de surfactante não iônico garante dinâmica do fluxo em todos os sistemas hidráulicos do aparelho. A ação eletrolítica aceita a contagem das células por impedância. Este reagente diferencia populações morfológicas de leucócitos e é utilizado nos ciclos de enxágue e limpeza dos sistemas hidráulicos do instrumento. O ABX VET Pack, R2 decompõe a membrana celular das hemácias. Pela adição do agente surfactante, a hemoglobina é libertada. Todo o ferro heme é oxidado e os complexos resultantes são quantificados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 530 nm. O detergente presente na solução também diferencia populações morfológicas de leucócitos. ABX VET Pack, R1 utiliza a ação combinada de uma enzima proteolítica com um detergente para eliminar os resíduos de proteína e evitar que os tubos hidráulicos fiquem obstruídos e/ou bloqueiem o fluxo. Também é usado para decompor os acúmulos de proteína nas aberturas e câmaras de contagem (Cintra et al. 2014a). A partir dos resultados obtidos, foi possível analisar os seguintes parâmetros: Hemáceas ( $10^6/\mu\text{L}$ ), Volume Globular (%), Hemoglobina (g/dL), VCM (fL), CHCM (%), Leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ ), Neutrófilos (%), Linfócito (%), Monócito (%) e Eosinófilo (%).

##### **4.2 – Análise Histológica das Articulações femuro-tibiais**

A análise das articulações foi realizada a fim de se comprovar o modelo experimental de indução da artrite reumatoide. Nesta análise, foram avaliadas lâminas submetidas à coloração de H&E e descritas a presença ou ausência dos sinais

característicos desta patologia, sendo eles, a presença de células inflamatórias mononucleares, hiperplasia sinovial, erosão da cartilagem e erosão óssea.

A análise da degradação do colágeno nas articulações foi realizada de forma descritiva em relação ao posicionamento e distribuição das fibras colágenas, empregando a coloração de TM (Cintra et al. 2017b).

Já a coloração de PSR observada sob a luz polarizada permitiu a quantificação de fibras maduras e imaturas, indicando o nível de maturação colágena. O programa QWin foi utilizado (ampliação de 400X, Leica QWin V3, Leica Microsystems), permitindo a seleção de cores que correspondem indiretamente ao tipo de fibra colágena. Após a seleção de cores, o programa calculou automaticamente a área marcada. As fibras amarelas esverdeadas são consideradas imaturas e finas, enquanto as fibras vermelhas amareladas são consideradas maduras e grossas (Benetti et al. 2020).

#### **4.3 – Análise Histológica das lesões periapicais**

A análise histológica foi realizada para traçar o perfil inflamatório das lesões periapicais. A intensidade do processo inflamatório foi analisada em conformidade com o número médio aproximado de células inflamatórias presentes em diferentes campos de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400x junto ao periápice dentário.

Escore 1: células inflamatórias ausentes ou em número desprezível;

Escore 2: infiltrado inflamatório discreto (menos de 10 células por campo);

Escore 3: infiltrado inflamatório moderado (entre 10 e 25 células por campo);

Escore 4: Infiltrado inflamatório intenso (mais que 25 células por campo).

A análise histométrica foi realizada para analisar de forma comparativa a extensão das lesões periapicais em função da artrite reumatoide. Foi utilizado o software Leica LAS 4.12 (Leica Microsystems, Nussloch – Germany) e os valores foram expressos em micrômetro quadrado ( $\mu\text{m}^2$ ) obtidos em medidas por área.

A análise da maturação do colágeno na região periapical foi realizada por meio das colorações de TM e PSR, conforme descrito no item 4.2.

#### **4.4 – Análise Estatística**

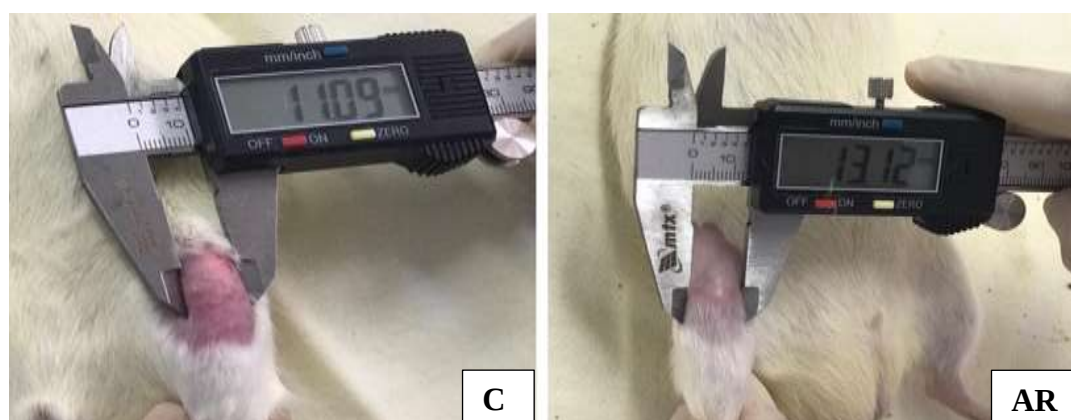
A análise estatística foi realizada por meio do programa SigmaPlot 12.0™ (Chicago, IL, USA). A verificação da distribuição normal das variáveis contínuas quantitativas foi feita pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Em seguida os dados que passaram no teste de normalidade foram submetidos aos testes de ANOVA,

seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas. Já os dados que não passaram no teste de normalidade foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis seguindo do teste de comparações múltiplas de Dunn (Dunn, 1958). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando a probabilidade foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 – Resultados

### 5.1 – Inchaço nos joelhos

A largura do joelho direito no sentido médio-lateral de todos os animais foi obtida com o auxílio de um paquímetro digital (Figura 3) nos dias 02, 07, 14, 21 e 30 do experimento. Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 1, onde os grupos AR e PA+AR, apresentaram maior largura, indicando inchaço articular, a partir do 7º dia de experimento, quando comparados aos grupos C e PA ( $p < 0,05$ ). Esses mesmos resultados foram observados nos dias 14, 21 e 30 do experimento.



**Figura 3.** Imagens representativas das mensurações das articulações femorotibiais dos grupos Controle (C) e AR (AR) empregando paquímetro digital, realizadas no período de 30 dias.

**Tabela 1.** Média e desvio padrão, em milímetros, das medidas da articulação femorotibial direita dos animais dos quatro grupos experimentais de acordo com o período de mensuração.

| Grupos       | Medidas da articulação femorotibial direita (Média $\pm$ DP em mm)* |                               |                               |                               |                               |
|--------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|              | Dia 2                                                               | Dia 7                         | Dia 14                        | Dia 21                        | Dia 30                        |
| <b>C</b>     | 10,37 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>                                       | 10,93 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup> | 11,46 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup> | 11,53 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup> | 11,98 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup> |
| <b>PA</b>    | 10,36 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>                                       | 10,82 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup> | 11,46 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup> | 11,59 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup> | 11,95 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup> |
| <b>AR</b>    | 10,45 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>                                       | 11,33 $\pm$ 0,62 <sup>b</sup> | 12,50 $\pm$ 0,91 <sup>b</sup> | 12,39 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup> | 12,76 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup> |
| <b>PA+AR</b> | 10,48 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>                                       | 11,30 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup> | 12,84 $\pm$ 0,44 <sup>b</sup> | 12,82 $\pm$ 0,77 <sup>b</sup> | 13,18 $\pm$ 0,37 <sup>b</sup> |

\*Letras iguais na mesma coluna demonstram ausência de diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Decorrido o período experimental, os animais foram anestesiados e tiveram seu sangue coletado para a realização do hemograma. Os resultados do hemograma são apresentados na Tabela 2.

## 5.2 – Hemograma

Os resultados do hemograma são apresentados na Tabela 2.

Com relação à série vermelha, foi observado aumento no volume corpuscular médio (VCM) no grupo PA+AR, em relação aos grupos C e PA ( $p < 0,05$ ). Com relação às células inflamatórias, foi observado aumento no número de leucócitos totais e linfócitos nos grupos PA, AR e PA+AR, comparados ao controle ( $p < 0,05$ ). Ainda, observou-se que os grupos PA e PA+AR apresentaram aumento superior ao grupo AR ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças estatísticas para Neutrófilos, Monócitos e Eosinófilos ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 2.** Média e Desvio Padrão dos parâmetros sanguíneos de todos os grupos experimentais.

| Parâmetros<br>Hematológicos            | Grupos (Média ± DP)*      |                           |                             |                           |
|----------------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
|                                        | C                         | PA                        | AR                          | AR+PA                     |
| <i>He</i> ( $\times 10^6/\mu L$ )      | 7,25 ± 0,73 <sup>a</sup>  | 6,79 ± 0,92 <sup>a</sup>  | 6,72 ± 0,88 <sup>a</sup>    | 6,65 ± 0,79 <sup>a</sup>  |
| <i>Hb</i> (g/dL)                       | 15,24 ± 1,00 <sup>a</sup> | 15,39 ± 0,54 <sup>a</sup> | 15,52 ± 1,18 <sup>a</sup>   | 15,50 ± 0,89 <sup>a</sup> |
| <i>VG</i> (%)                          | 45,10 ± 2,81 <sup>a</sup> | 44,90 ± 1,97 <sup>a</sup> | 44,70 ± 3,30 <sup>a</sup>   | 45,30 ± 2,50 <sup>a</sup> |
| <i>VCM</i> (fL)                        | 62,54 ± 3,73 <sup>a</sup> | 66,99 ± 7,38 <sup>a</sup> | 67,13 ± 25,89 <sup>ab</sup> | 68,85 ± 7,83 <sup>b</sup> |
| <i>CHCM</i> (%)                        | 33,80 ± 1,02 <sup>a</sup> | 34,31 ± 1,25 <sup>a</sup> | 34,73 ± 1,02 <sup>a</sup>   | 34,22 ± 0,84 <sup>a</sup> |
| <i>Leucócitos</i><br>( $10^2/\mu L$ )  | 67,30 ± 5,31 <sup>a</sup> | 85,75 ± 5,42 <sup>b</sup> | 81,85 ± 5,15 <sup>c</sup>   | 89,00 ± 4,15 <sup>b</sup> |
| <i>Neutrófilos</i><br>( $10^2/\mu L$ ) | 21,25 ± 3,64 <sup>a</sup> | 22,99 ± 4,95 <sup>a</sup> | 21,07 ± 8,92 <sup>a</sup>   | 21,45 ± 3,29 <sup>a</sup> |
| <i>Linfócitos</i><br>( $10^2/\mu L$ )  | 43,44 ± 4,44 <sup>a</sup> | 58,89 ± 4,56 <sup>b</sup> | 56,59 ± 7,56 <sup>c</sup>   | 63,18 ± 4,28 <sup>b</sup> |
| <i>Monócitos</i><br>( $10^2/\mu L$ )   | 2,54 ± 1,09 <sup>a</sup>  | 3,00 ± 1,94 <sup>a</sup>  | 3,18 ± 1,64 <sup>a</sup>    | 3,02 ± 1,88 <sup>a</sup>  |
| <i>Eosinófilos</i><br>( $10^2/\mu L$ ) | 0,66 ± 0,62 <sup>a</sup>  | 0,86 ± 0,70 <sup>a</sup>  | 0,90 ± 0,88 <sup>a</sup>    | 1,24 ± 0,75 <sup>a</sup>  |

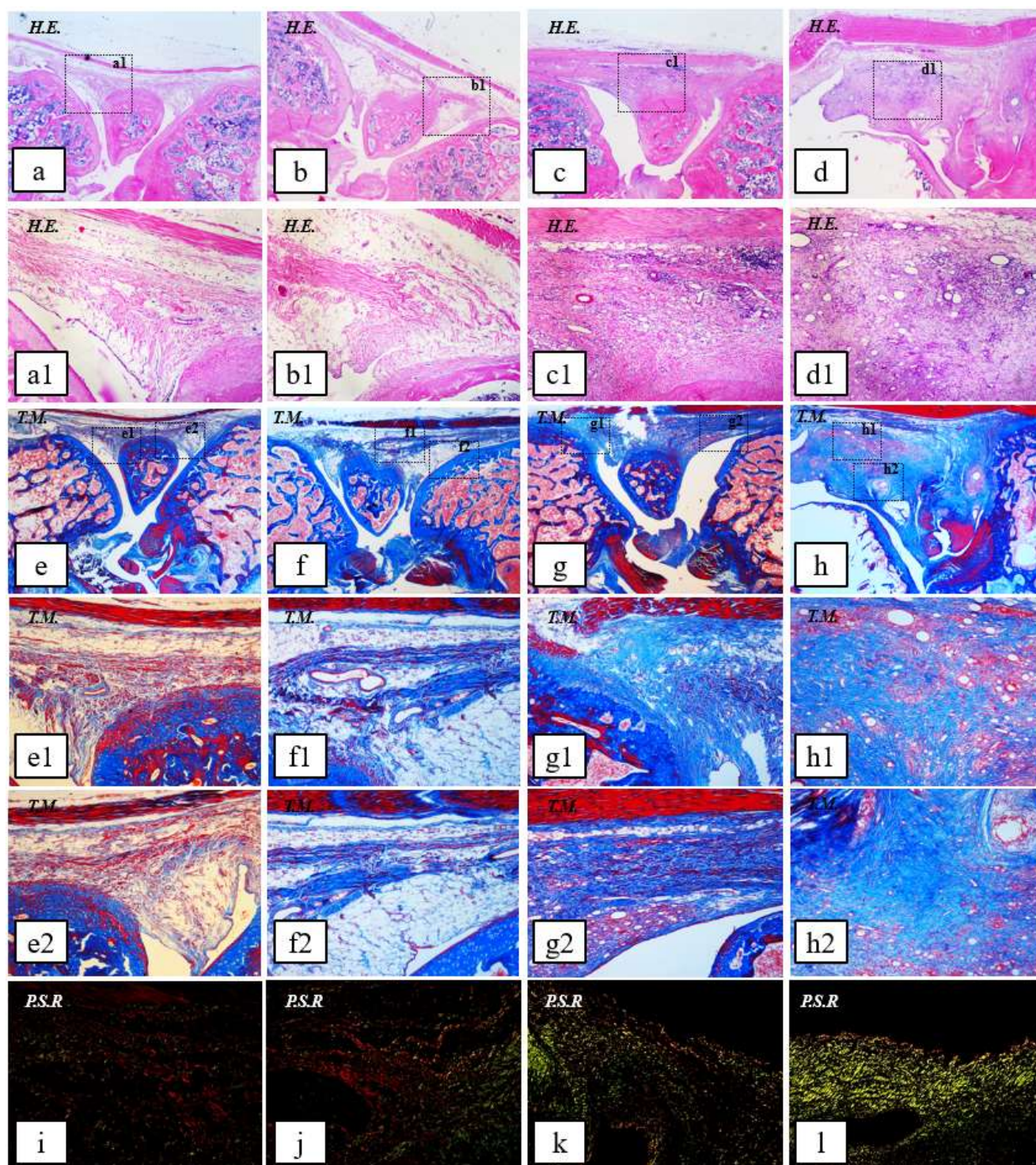
\*Letras iguais na mesma linha demonstram ausência de diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).



**Legenda:** Hemácias (He), Hemoglobina (Hb), Volume Globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Leucócitos, Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos e Eosinófilos

### **5.3 – Análises histológicas das articulações femorotibiais**

Após a coleta sanguínea, os animais foram eutanasiados e as articulações femorotibiais coletadas e processadas para a coloração de H&E com a finalidade de descrever o infiltrado inflamatório e a destruição articular presentes para a comprovação do modelo experimental. Além disso, as colorações de TM e PSR também foram realizadas para avaliação da organização das fibras colágenas e maturação colágena, respectivamente. As imagens representativas de cada grupo para as colorações citadas podem ser observadas na figura 4.



**Figura 4.** Fotomicrografias representativas das articulações femorotibiais no período de 30 dias. A coloração de H&E (a-d e a1-d1) nos grupos C (a, a1) e PA (b,b1) mostrou a região da articulação com ausência de infiltrado inflamatório; Os grupos AR (c, c1) e PA+AR (d, d1) denotando exacerbado infiltrado inflamatório na região articular com predominância de células mononucleares, espessamento do tendão e de vasos sanguíneos. A coloração de TM (e-h, e1-h1 e e2-h2) nos grupos C (e, e1) e PA (f, f1) apresentaram integridade das fibras colágenas e organização tecidual; Os grupos PA (g, g1) e PA+AR (h, h1) apresentaram exacerbada quantidade de tecido colagenoso (azul) e de vasos sanguíneos (vermelho). A coloração de PSR (i-l) nos grupos C (i) e PA (j) demonstrou a integridade das fibras colágenas com maior

*porcentagem de fibras maduras; Os grupos PA (k) e PA+AR (l) demonstrando maior quantidade significativa de fibras colágenas imaturas na região articular. [H&E: a-d 50x, a1-d1 100x; TM: e-h 25x, e1-h2 100x; PSR: i-l 400x].*

A análise da articulação femorotibial tanto para a coloração de H&E (a-d) quanto para a coloração de TM foi de forma observacional e descritiva. Com relação à primeira coloração, nos grupos C e PA foram observadas características de normalidade com organização dos tecidos subjacentes. Já os grupos AR e PA+AR apresentaram intenso infiltrado inflamatório com predominância de células mononucleares, fibrosas, osteoclastos, erosões ósseas e vasos sanguíneos, comprovando, desta maneira, as características histopatológicas encontradas nas articulações de pacientes com artrite reumatoide.

Cortes sagitais da parte anterior da articulação do joelho com a coloração de TM podem ser observados na figura 4. Os grupos C e PA apresentaram continuidade e integridade das fibras colágenas, demonstrando, portanto, características encontradas em indivíduos saudáveis. Já os grupos AR e PA+AR tiveram um aumento na quantidade de tecido colagenoso e de vasos sanguíneos, comuns nesta desordem.

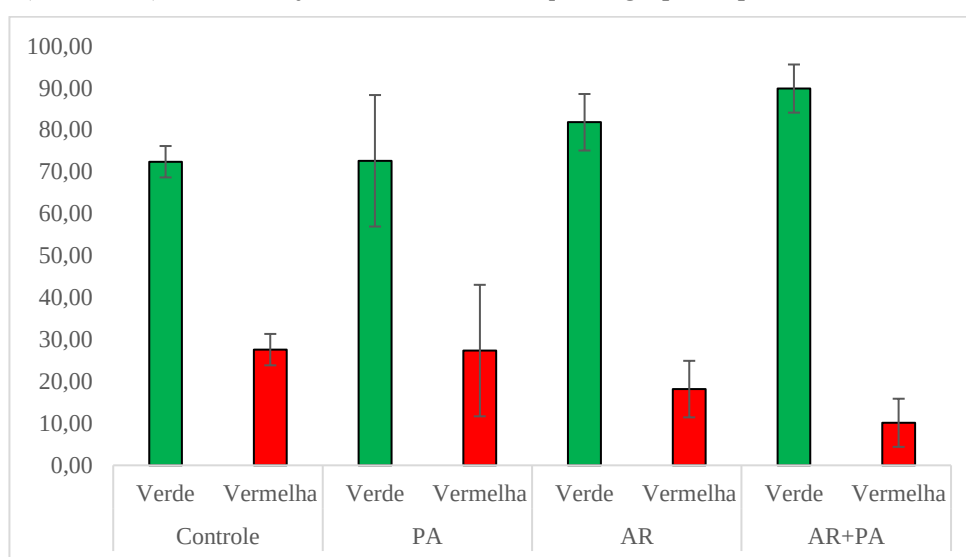
Com relação à coloração de PSR das articulações, foi utilizado o software Leica para a quantificação (em % de área) das fibras verdes e vermelhas. Os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise estatística. Os resultados podem ser observados na tabela 3. O grupo PA+AR apresentou maior porcentagem de fibras verdes (imaturas), quando comparado aos demais grupos, com diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ). Consequentemente, a porcentagem de fibras vermelhas (maduras) foi menor neste mesmo grupo. Os grupos C e PA apresentaram a menor porcentagem de fibras verdes, entretanto, a maior taxa de fibras vermelhas quando comparados aos demais grupos, com diferenças significativas estatisticamente ( $p < 0,05$ ). Os resultados estão representados no gráfico 1.

**Tabela 3.** Média e desvio padrão da porcentagem de fibras colágenas imaturas (verdes) e maduras (vermelhas) na articulação femorotibial nos quatro grupos experimentais.

| Fibras %        | Grupos                    |                            |                           |                           |
|-----------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                 | C                         | PA                         | AR                        | PA+AR                     |
| <b>Verde</b>    | 72,41 ± 3,75 <sup>a</sup> | 72,63 ± 15,68 <sup>a</sup> | 81,82 ± 6,74 <sup>b</sup> | 89,95 ± 5,74 <sup>c</sup> |
| <b>Vermelha</b> | 27,59 ± 3,75 <sup>a</sup> | 27,37 ± 15,68 <sup>a</sup> | 18,18 ± 6,74 <sup>b</sup> | 10,15 ± 5,74 <sup>c</sup> |

\*Letras iguais na mesma linha demonstram ausência de diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

**Gráfico 1.** Média e desvio padrão da porcentagem de fibras colágenas imaturas (verdes) e maduras (vermelhas) na articulação femorotibial nos quatro grupos experimentais.



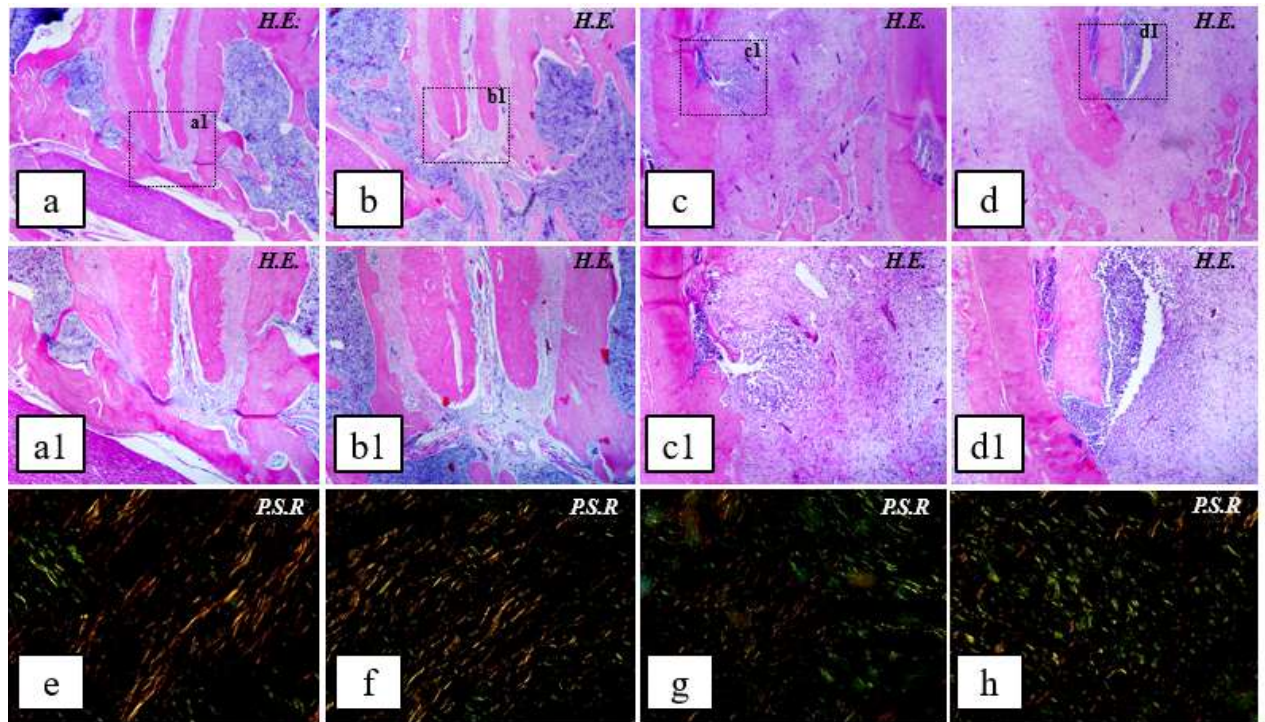
#### 5.4 – Análises histológicas das lesões periapicais

Ainda, nesse estudo avaliamos os efeitos da AR no desenvolvimento e progressão da PA por meio da coloração de H&E nas mandíbulas. Além disso, a análise da maturação colágena também foi realizada nas lesões periapicais pela coloração de PSR. As imagens representativas de cada grupo e coloração podem ser observadas na Figura 5.

Em relação à análise das lâminas coradas em H&E, os scores atribuídos ao perfil inflamatório estão apresentados na tabela 6. O grupo PA apresentou infiltrado moderado, enquanto o grupo PA+AR apresentou infiltrado inflamatório intenso ( $p < 0,05$ ). Por meio da análise histométrica verificamos a reabsorção óssea periapical no valor de  $33,34 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  no grupo PA e reabsorção óssea ainda maior no grupo PA+AR, no valor de  $40,17 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ , com diferença estatística entre os grupos ( $p < 0,05$ ) (tabela 5).



Os resultados observados demonstraram que a AR foi capaz de exacerbar o infiltrado inflamatório da PA, bem como favorecer o aumento da reabsorção óssea periapical.



**Figura 5.** Fotomicrografia da região periapical no período de 30 dias. A coloração de H&E (a-d) nos grupos C (a, a1) e AR (b,b1) apresentou região apical com ausência de infiltrado inflamatório e reabsorção óssea; O grupo PA (c, c1) apresentou moderado infiltrado inflamatório em torno do ápice radicular, desorganização do ligamento periodontal e área de reabsorção óssea; O grupo PA+AR (d, d1) apresentou intenso infiltrado inflamatório, bem como extensa área de reabsorção óssea periapical, reabsorções cementária e dentinária, além de desorganização do ligamento periodontal. A coloração de PSR nos grupos C (e) e AR (f) evidenciou integridade das fibras colágenas com maior porcentagem de fibras maduras; Os grupos PA (g) e PA+AR (h) demonstraram maior quantidade de fibras colágenas imaturas na região periapical. [H&E: a-d 50x, a1-d1 100x; PSR: e-h 400x].

**Tabela 4.** Escores, Mediana, Média, Desvio Padrão (DP) das análises histológica e histométrica da região periapical.

| Critérios de análise                                                      |             | C              | PA                            | AR             | PA+AR                      |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------|----------------|-------------------------------|----------------|----------------------------|
| Infiltrado<br>Inflamatório                                                | 1: ausente  | 10/10          | 0/10                          | 0/10           | 0/10                       |
|                                                                           | 2: médio    | 0/10           | 2/10                          | 0/8            | 0/10                       |
|                                                                           | 3: moderado | 0/10           | 4/10                          | 0/8            | 1/10                       |
|                                                                           | 4: severo   | 0/10           | 4/10                          | 0/8            | 9/10                       |
|                                                                           | Mediana*    | 1 <sup>a</sup> | 3 <sup>b</sup>                | 1 <sup>a</sup> | 4 <sup>c</sup>             |
| Reabsorção óssea Periapical<br>(x10 <sup>4</sup> 4 µm <sup>2</sup> ± DP)* |             | -              | 33,34 ±<br>39,20 <sup>a</sup> | -              | 40,17 ± 39,91 <sup>b</sup> |

\*Letras iguais na mesma linha demonstram ausência de diferença estatística entre os grupos ( $p>0,05$ ).

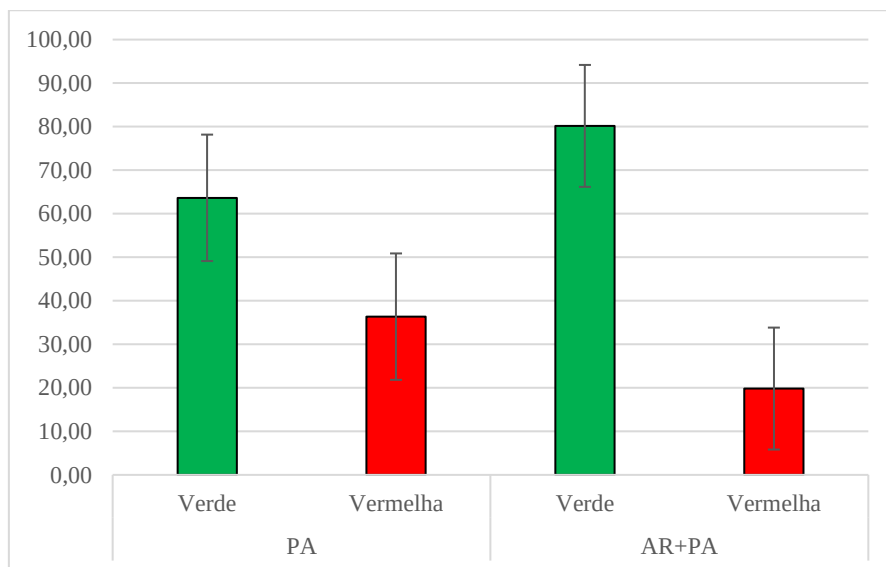
As fibras colágenas da região periapical da raiz distal do primeiro molar inferior foram quantificadas utilizando o software Leica, utilizando-se da coloração de PSR observada sob luz polarizada. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística e os resultados podem ser observados na tabela 5. O grupo PA+AR apresentou maior porcentagem de fibras verdes (imaturas), quando comparado ao outro grupo com periodontite apical (grupo PA) com diferenças estatisticamente significantes ( $p<0,05$ ). Consequentemente, a porcentagem de fibras vermelhas (maduras) foi menor neste mesmo grupo. Os resultados estão representados no gráfico 2.

**Tabela 5.** Média e desvio padrão da % de fibras colágenas maduras e imaturas na região periapical dos grupos experimentais.

| Tipo de Fibra % | Grupos                     |                            |
|-----------------|----------------------------|----------------------------|
|                 | PA                         | PA+AR                      |
| Verde           | 63,65 ± 14,52 <sup>a</sup> | 80,17 ± 14,01 <sup>b</sup> |
| Vermelha        | 36,35 ± 14,52 <sup>a</sup> | 19,83 ± 14,01 <sup>b</sup> |

\*Letras iguais na mesma linha demonstram ausência de diferença estatística entre os grupos ( $p>0,05$ ).

**Gráfico 2.** Média e desvio padrão da % de fibras colágenas maduras e imaturas na região periapical dos grupos experimentais.



## 6- Discussão

Este estudo avaliou a relação da periodontite apical (PA) com a artrite reumatoide (AR), por meio do estudo em tecido hematológico, lesões periapicais e articulações femorotibiais. A partir dos resultados obtidos ficou evidente a relação positiva entre a PA e a AR, onde a associação PA+AR interferiu em parâmetros sanguíneos do hemograma, no perfil inflamatório e reabsorção de lesões periapicais, bem como no processo de maturação colágena em lesões periapicais e nas articulações femorotibiais.

Neste estudo empregamos o modelo da periodontite apical induzida por meio da exposição pulpar de molares de ratos *Wistar*, permitindo o desenvolvimento da infecção bacteriana a partir do ambiente oral. Este modelo experimental vem sendo utilizado pelo nosso grupo de pesquisa nos últimos anos e tem se demonstrado efetivo para os estudos em medicina endodôntica (Cintra et al. 2013, Cintra et al. 2014).

A artrite reumatoide é definida como uma doença inflamatória crônica, sistêmica e progressiva, de caráter autoimune, que acomete articulações diartrodiais simetricamente ao induzir proliferação da membrana sinovial, erosão da cartilagem articular, infiltrado de células inflamatórias nos espaços periarticulares e destruição óssea (Culsha et al. 2011, Firestein 2003; Scott et al. 2010). A AR é uma doença em que um “gatilho imunológico” desencadeia um processo inflamatório e leva a sinais e sintomas clínicos como edema, dor articular, destruição da cartilagem e osso. Apesar dos inúmeros estudos sobre AR ao longo da história da ciência, esse fator de desencadeamento da doença ainda parece ser

uma incógnita. Existem evidências de que agentes infecciosos, predisposição genética ou outras condições induzam uma resposta inflamatória com formação de autoanticorpos que caracterizam a AR (Culsha et al. 2011, Scott et al. 2010, Smolen & Steiner 2003).

Entre os modelos experimentais de AR mais utilizados na literatura está o de artrite induzida por antígeno-adjuvante (Bar et al. 2004, Wenger et al. 2007). Neste modelo, a albumina de soro bovino metilada (mBSA) é utilizada como antígeno protéico associada ao adjuvante completo de Freund, o que induz uma resposta imune mediada por células T na presença desse antígeno e desencadeia um quadro histopatológico caracterizado por intenso infiltrado inflamatório, exsudato articular, formação de pannus na articulação desafiada e presença de nódulos linfóides no processo crônico da doença. Ou seja, há uma similaridade das manifestações clínicas e da natureza imunológica da patogênese da doença entre o modelo experimental e a condição humana, o que fornece uma alternativa valiosa para o estudo dos mecanismos da AR (Hegen et al. 2008, Pearson & Wood 1963, Santos et al. 2001; Thorbecke et al. 1992, Wengner et al. 2007). No presente estudo a largura dos joelhos, contendo as articulações femorotibiais, foi mensurado com o auxílio de um paquímetro digital durante todo o período experimental. Os grupos AR e PA+AR apresentaram maior largura indicando inchaço articular característico desta patologia (Oliveira et al. 2017).

A análise do perfil hematológico é um método utilizado para verificar a associação de infecções bucais com alterações sistêmicas e seus efeitos na saúde e homeostase corporal (Gkrania-Klotsaset al. 2010). A análise sanguínea é frequentemente utilizada para avaliar a presença de infecção ou inflamação, permitindo determinar quando a periodontite apical afeta os parâmetros hematológicos (Cintra et al. 2014a). Estudos mostraram as diferenças nos parâmetros hematológicos de ratos normais comparados aos ratos diabéticos na presença ou não de periodontite apical e/ou doença periodontal (Cintra et al. 2014a) e em múltiplos focos da periodontite apical (Cintra et al. 2014, Taylor & Borgnakke 2008), por este motivo, acreditamos ser de extrema importância a realização deste exame laboratorial.

O volume corpuscular médio (VCM), é um reflexo da heterogeneidade do volume das hemácias e é tradicionalmente utilizado para o diagnóstico diferencial dos diferentes tipos de anemia. Recentemente, vários estudos têm mostrado que o VCM está significativamente correlacionado com o nível de inflamação de doenças sistêmicas (Korantzopoulos et al. 2015) No presente estudo, o VCM apresentou-se elevado nos grupos artríticos (AR e PA+PA). Baseado nestes resultados, é possível concluir que



indivíduos com AR possuem hemácias com dimensões maiores do que indivíduos saudáveis. Estes achados corroboram com outro estudo (He et al. 2017), onde os autores investigaram a possibilidade deste parâmetro, o VCM, se tornar um biomarcador para a detecção de artrite reumatoide. No estudo foram avaliados pacientes com artrite reumatoide, osteoartrite e indivíduos saudáveis e a partir dos resultados obtidos, os autores chegaram à conclusão de que indivíduos com AR possuíam maior VCM, comprovando a possibilidade deste parâmetro ser um biomarcador de fácil detecção para AR. Este evento ocorre porque as hemácias estão envolvidas na patobiologia da AR (Olumuyiwa-Akeredolu & Pretorius 2015). Sendo assim, a função mais importante dessas células sanguíneas não é apenas transportar oxigênio, mas também para participar dos processos inflamatórios e da coagulação (Pretorius 2013, Pretorius et al. 2016). Pretorius (2013) utilizou a microscopia eletrônica de varredura para descobrir que a ultraestrutura das hemácias é alterada em doenças inflamatórias, possivelmente devido à formação de radicais hidroxila, que acabam levando à inflamação.

Além deste achado, o presente estudo também apresentou alterações na contagem de leucócitos e linfócitos. Em ambos, a contagem foi maior em PA e PA+AR, sendo seguidos pelos valores do grupo AR. Com relação à PA, já está comprovado o aumento da contagem de linfócitos no sangue (Samuel et al. 2017). Desta forma, sabe-se que o aumento no número de células inflamatórias resultantes da periodontite apical pode aumentar os efeitos deletérios das doenças autoimunes, podendo também ativar mediadores inflamatórios e aumentar o estresse oxidativo, exacerbando a inflamação em diferentes partes do corpo (Bian et al. 2012). Nos grupos com a enfermidade artrítica (AR e PA+AR) também foram observadas alterações na série branca do hemograma, resultados esses que corroboram com os já consolidados na literatura, por se tratar de uma doença auto-imune (He et al. 2017). Uma vez que as vias biológicas que ativam a inflamação e a autoimunidade são as mesmas, a presença de periodontite apical poderia aumentar os efeitos deletérios das doenças autoimunes, e a patogênese da doença autoimune também pode potencializar os efeitos da periodontite apical em uma relação bidirecional (Gomes et al. 2013, Gomes et al. 2015), entretanto, os resultados obtidos demonstram que, a nível sanguíneo, a PA não foi capaz de interferir em AR e vice-versa.

A análise histológica das articulações se deu por meio das colorações de H&E, PSR e TM. Todos os animais dos grupos portadores de artrite apresentaram sinais clássicos da doença, como por exemplo, infiltrado inflamatório exacerbado, pannus, erosão óssea e cartilaginosa (Little et al. 2013, Tanaka et al. 2014), comprovando, desta maneira, o

sucesso na indução do modelo experimental. Os resultados na coloração de TM corroboram com os achados de Takashi et al. 2018, em que foram observados o espessamento do tendão e calcificações ectópicas.

O estudo histoquímico do colágeno tem permitido uma melhor compreensão da biologia desta família de macromoléculas (Montes & Junqueira 1991). Os métodos de polarização do PSR contribuem significativamente para o nosso melhor conhecimento da função e patologia do colágeno (Montes & Junqueira 1991). As fibras de colágeno são moléculas altamente anisotrópicas que apresentam birrefringência natural (Spiesz et al. 2011). No entanto, cortes de tecido corados com PSR e visualizados através da luz polarizada, apresentam a birrefringência aumentada e diferentes padrões de cores (Rittié 2017). As áreas anisotrópicas mostram forte birrefringência e são visualizadas em uma cor alaranjada/avermelhada, indicando maior teor de feixes regularmente organizados de fibras colágenas. Enquanto isso, uma birrefringência fraca é vista como regiões escuras/verdes e indica maior conteúdo de fibras colágenas desorganizadas (Lattouf et al. 2014). Na análise de PSR das articulações, o grupo PA+AR também apresentou uma porcentagem significativamente menor de fibras colágenas maduras e uma porcentagem significativamente maior de fibras colágenas imaturas do que o grupo AR. Na literatura não existem estudos que correlacionem estes achados, entretanto, a partir deles é possível especular a possível interferência da presença da periodontite apical na evolução sistêmica da artrite reumatoide, especialmente com relação à maturação colágena. Possivelmente, o aumento no número de células inflamatórias resultantes da PA a nível sanguíneo foi capaz de aumentar os efeitos deletérios da doença autoimune, ativando mediadores inflamatórios, aumentar o estresse oxidativo, exacerbando a inflamação em diferentes partes do corpo (Bian et al. 2012) e retardando o processo de maturação colágena nas articulações.

Com relação à análise histológica na mandíbula, o exame microscópico não revelou inflamação e reabsorção óssea nos grupos C e AR, já nos grupos PA e PA+AR lesões periapicais foram observadas. Histologicamente o infiltrado inflamatório periapical do grupo PA+AR foi mais intenso, apresentando mais células inflamatórias quando comparado ao grupo PA. Além disso, a área de reabsorção óssea decorrente da presença da lesão periapical foi significativamente maior na presença da AR. Esses resultados corroboram com estudos prévios sobre outras desordens sistêmicas e a periodontite apical (Kodama et al. 2011, Cintra et al. 2014a), onde ratos diabéticos (Cintra et al. 2014a) e portadores de fibrose hepática (Cantiga-Silva et al. 2021) apresentavam

maior inflamação e maior lesão periapical quando comparados à ratos normais. Entretanto, existem poucos estudos na literatura elucidando a relação existente entre a AR e a PA. Karatas e colaboradores (2020) realizaram um estudo clínico em que observaram a predominância de lesões periapicais em pacientes portadores de AR quando comparados à pacientes saudáveis. As possíveis explicações para os achados de ambas as pesquisas desenvolvidas é de que a AR é caracterizada pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-17 e TNF- $\alpha$  (Cotti et al. 2018). Essas citocinas são predominantes tanto na patogenicidade da AR quanto da PA. Esta fisiopatologia semelhante de ambas as doenças poderia explicar a associação significativa entre elas. Além disso, a progressão de ambas as doenças inclui o processo de reabsorção óssea através da ativação do receptor ativador do fator nuclear kappa B (NF-kB) (Cotti et al. 2018). Desta forma, como a literatura indica maior prevalência de lesões periapicais em pacientes com AR e nossos achados indicam maior severidade da PA em animais com AR, parece haver relação positiva entre as duas enfermidades.

Em contrapartida, a relação existente entre a AR e a periodontite já é bem consolidada e conhecida. Desde os anos 60 existem estudos que indicam que pacientes com AR apresentam maiores índices de perda óssea alveolar e edentulismo quando comparados a indivíduos saudáveis (Liubomorova 1964; Malmstrom & Calonius 1975). Pischon et al. (2008) avaliaram a prevalência de DP em indivíduos com AR e detectaram que o risco de pacientes artríticos apresentarem DP era quase 6 vezes maior que o de pacientes sem AR, e que a deficiência de higienização oral apresenta pouca influência nessa correlação. Além disso, os autores mostraram que a associação entre AR e DP era maior que as interações já bem estabelecidas entre fumo, consumo de álcool e obesidade versus DP. Observou-se ainda que a AR se relacionava à periodontite independentemente de características demográficas e de estilo de vida (idade, sexo, grau de escolaridade, fumo, consumo de álcool). Em um estudo experimental em ratos, Ramamurthy et al. (2005) demonstraram que a artrite é capaz de desencadear uma significativa perda óssea alveolar e mobilidade dentária. Além disso, outros estudos apoiaram a hipótese de que a relação entre AR e DP decorre dos mecanismos imunopatogênicos semelhantes das duas doenças. Trombone et al. (2010) mostraram, em linhagens de camundongos selecionados geneticamente, que um genótipo hiper-inflamatório é essencial para que a AR agrave os sinais de DP induzida por bactéria. Park et al. (2011) demonstraram, por meio de ensaios in vitro, que células obtidas de osso alveolar de camundongos com AR induzida por colágeno apresentavam maior atividade osteoclástica e menor atividade de formação

óssea, e esses achados foram associados à maior perda óssea alveolar nesses camundongos. Sendo assim, as evidências apontam que a interação entre AR e DP ou AR e PA deve ocorrer, predominantemente, pela convergência e semelhança dos mecanismos patogênicos das doenças em indivíduos susceptíveis.

Além do perfil inflamatório das lesões periapicais, a maturação das fibras colágenas também foi investigada por meio da coloração de PSR nas mandíbulas. Na região periapical das mandíbulas, o grupo PA+AR apresentou uma porcentagem significativamente menor de fibras colágenas maduras e uma porcentagem significativamente maior de fibras colágenas imaturas do que o grupo PA. Esses resultados mostram que a presença da AR dificultou a maturação da fibra colágena na região periapical de ratos com periodontite induzida. Sabe-se que, na AR, pode haver modificação de proteínas como o colágeno pela ação de mediadores e metabólitos produzidos durante o processo inflamatório, por exemplo espécies reativas de oxigênio. Essas modificações podem favorecer a produção de auto-anticorpos que, em contrapartida, poderão induzir aumento da reatividade a essas proteínas (Nissim et al. 2005). Já foi mostrado, principalmente para a AR, que os anticorpos que se ligam a auto-antígenos podem desencadear uma reação inflamatória nos tecidos, possivelmente via liberação de enzimas que degradam o tecido (i.e. metaloproteinases de matriz) e de citocinas por células inflamatórias (Mullazehi et al. 2006). Apesar do resultados aqui encontrados, este é o primeiro estudo em modelo experimental in vivo a respeito da relação existente entre a PA e a AR, desta maneira, outros estudos se fazem necessário para investigar mais profundamente esta relação e confirmar os achados aqui presentes.

## **7 - Conclusão**

Pode-se concluir ser positiva a relação entre a PA e a AR, onde a associação PA+AR interferiu em parâmetros sanguíneos do hemograma, no perfil inflamatório e reabsortivo de lesões periapicais, bem como no processo de maturação colágena em lesões periapicais e nas articulações femorotibiais.

## 8- Referências

1. Alessandri C, Priori R, Modesti M, Mancini R, Valesini G. The role of anti-cyclic cytrullinate antibodies testing in rheumatoid arthritis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2008 Feb;34(1):45-9.
2. Astolpho RD, Curbete MM, Chiba FY, Cintra LT, Ervolino E, da Mota MS, Antoniali C, Garbin CA, Sumida DH. Periapical Lesions Decrease Insulin Signaling in Rat Skeletal Muscle. *J Endod*. 2015 Aug;41(8):1305-10.
3. Astolpho RD, Curbete MM, Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, Prieto AK, Cintra LT, Bomfim SR, Ervolino E, Sumida DH. Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. *J Endod*. 2013 May; 39(5):648-52.
4. Azuma MM, Gomes-Filho JE, Cardoso CBM, Pipa CB, Narciso LG, Bomfim SRM, et al. Omega 3 Fatty Acids Reduce the Triglyceride Levels in Rats with Apical Periodontitis. *Braz Dental J*. 2018; 29:173-8.
5. Azuma MM, Gomes-Filho JE, Prieto AKC, Samuel RO, de Lima VMF, Sumida DH, Ervolino E, Cintra LTA. Diabetes increases interleukin-17 levels in periapical, hepatic, and renal tissues in rats. *Arch Oral Biol*. 2017;83:230-235.
6. Bar KJ, Schaible HG, Brauer R, Halbhauer KJ, von Banchet GS. The proportion of TRPV1 protein-positive lumbar DRG neurones does not increase in the course of acute and chronic antigen-induced arthritis in the knee joint of the rat. *Neuroscience letters*. 2004;361(1-3): 172-5.
7. Billings F. Chronic focal infections and their etiologic relations to arthritis and nephritis. *Arch Intern Med*, 1912;9:484-98.
8. Brink M, Hansson M, Mathsson-Alm L, Wijayatunga P, Verheul MK, Trouw LA, Holmdahl R, Rönnelid J, Klareskog L, Rantapää-Dahlqvist S. Rheumatoid factor isotypes in relation to antibodies against citrullinated peptides and carbamylated proteins before the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2016;9: 18:43.
9. Cantiga-Silva C, Estrela C, Segura-Egea JJ, Azevedo JP, de Oliveira PHC, Cardoso CBM, Pinheiro TN, Ervolino E, Sivieri-Araújo G, Cintra LTA. Inflammatory profile of apical periodontitis associated with liver fibrosis in rats: histological and immunohistochemical analysis. *Int Endod J*. 2021;54(8):1353-61.
10. Cecil RL, Archer BH. Chronic infectious arthritis; an analysis of 200 cases. *Am J Med Sci*. 1927;173:258-70.

11. Ceccarelli F, Saccucci M, Di Carlo G, Lucchetti R, Pilloni A, Pranno N, Luzzi V, Valesini G, Polimeni A. Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: The Same Inflammatory Mediators? *Mediators Inflamm.* 2019;2019:6034546.
12. Cintra LTA, Gomes MS, da Silva CC, Faria FD, Benetti F, Cosme-Silva L, Samuel RO, Pinheiro TN, Estrela C, González AC, Segura-Egea JJ. Evolution of endodontic medicine: a critical narrative review of the interrelationship between endodontics and systemic pathological conditions. *Odontology.* 2021;109(4):741-769.
13. Cintra LTA, Estrela C, Azuma MM, Queiroz ÍOA, Kawai T, Gomes-Filho JE. Endodontic medicine: interrelationships among apical periodontitis, systemic disorders, and tissue responses of dental materials. *Braz Oral Res.* 2018;18:32(suppl 1):e68.
14. Cintra LT, da Silva Facundo AC, Azuma MM, Sumida DH, Astolphi RD, Bomfim SR, Narciso LG, Gomes-Filho JE. Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats. *Clin Oral Investig.* 2013a; 17:1595-9.
15. Cintra LT, da Silva Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Narciso LG, Mogami Bomfim SR, Oliveira e Silva C, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. *J Endod.* 2014a; 40(8):1139-44.
16. Cintra LT, Facundo ACS, Valentim D, Prieto AKC, Silva CO, Sumida DH, Bomfim SRM, Dezan-Junior E, Gomes-Filho JE. Effect of Oral Infections on Serum Creatinine Levels in Diabetic Rats. *Int J Diabet Vasc Dis Res.* 2013b; 1(3):1-6.
17. Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, de Queiróz AO, Ervolino E, Sumida DH, de Lima VM, Gomes-Filho JE. Multiple Apical Periodontitis Influences Serum Levels of Cytokines and Nitric Oxide. *J Endod.* 2016; 42(5):747-51
18. Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, de Lima VM, Sumida DH, Coclete GA, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Apical periodontitis and periodontal disease increase serum IL-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. *Clin Oral Investig.* 2014b Dec; 18(9):2123-8.
19. Cintra LT, Samuel RO, Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Bomfim SR, Souza JC, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. *Int Endod J.* 2014c; 47(3):228-37.

20. Cintra LT, Samuel RO, Prieto AK, Sumida DH, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Oral health, diabetes, and body weight. *Arch Oral Biol.* 2017a;73:94-99.
21. Clavel C. et al. Induction of macrophage secretion of TNF $\alpha$  through Fc $\gamma$  receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum.* 2008;58:78-88.
22. Colégio Americano de Reumatologia, 2021. <https://www.rheumatology.org/>
23. Conti LC, Segura-Egea JJ, Cardoso CBM, Benetti F, Azuma MM, Oliveira PHC, Bomfim SRM, Cintra LTA. Relationship between apical periodontitis and atherosclerosis in rats: lipid profile and histological study. *Int Endod J.* 2020;53(10):1387-1397.
24. Cotti E, Schirru E, Acquas E, Usai P. An overview on biologic medications and their possible role in apical periodontitis. *J Endod.* 2014; 40(12):1902–11.
25. Culshaw S, Mcinnes IB, Liew FY. What can the periodontal community learn from the pathophysiology of rheumatoid arthritis? *J. Clin. Periodontol.* 2011;38:106-13.
26. de Molon RS, Rossa C Jr, Thurlings RM, Cirelli JA, Koenders MI. Linkage of Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Current Evidence and Potential Biological Interactions. *Int J Mol Sci.* 2019;13:20(18):4541.
27. Ferreira LL, Gomes JE Filho, Sumida DH, Bonfim SRM, Sivieri-Araújo G, Guimarães G, Cintra LTA. Diabetic Rats Present High Mean Platelet Count in the Presence of Oral Infections. *Braz Dent J.* 2017;28(5):548-551.
28. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003 May 15;423(6937):356-61.
29. Gierut A, Perlman H, Pope RM. Innate immunity and rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010;36(2):271-96.
30. Gomes-Filho JE, Wayama MT, Dornelles RC, Ervolino E, Yamanari GH, Lodi CS, Sivieri-Araújo G, Dezan-Júnior E, Cintra LT. Raloxifene modulates regulators of osteoclastogenesis and angiogenesis in an oestrogen deficiency periapical lesion model. *Int Endod J.* 2015;48(11):1059-68.
31. Hegen M, Keith JC Jr, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(11):1505-15.
32. Karataş E, Kul A, Tepecik E. Association between Rheumatoid Arthritis and Apical Periodontitis: A Cross-sectional Study. *Eur Endod J.* 2020;5(2):155-158.

33. Klareskog L, Rönnelid J, Saevarsdottir S, Padyukov L, Alfredsson L. The importance of differences; On environment and its interactions with genes and immunity in the causation of rheumatoid arthritis. *J Intern Med.* 2020;287(5):514-533.
34. Korantzopoulos P, Sontis N, Liu T, Chlapoutakis S, Sismanidis S, Siminelakis S, Apostolakis E (2015) Association between red blood cell distribution width and postoperative atrial fibrillation after cardiac surgery: a pilot observational study. *Int J Cardiol.* 2015;185:19–21.
35. Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K, Changotade S. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem.* 2014;62:751–8.
36. Little JW, Falace DA, Miller CS, Rhodus NL. Rheumatologic and connective tissue disorders. *Dental Management of the Medically Compromised Patient.* Mosby. 2013:320–46.
37. Liubomorova LM. State of periodontium in patients affected with rheumatism. *Stomatology.* 1964;43:33-7.
38. Malstrom M, Calonius PEB. Teeth loss and inflammation of teeth supporting tissues in rheumatoid disease. *Scand. J. Rheumatol.* 1975;49-55.
39. 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(3):297-300
40. Martins CM, Sasaki H, Hirai K, Andrada AC, Gomes-Filho JE. Relationship between hypertension and periapical lesion: an in vitro and in vivo study. *Braz Oral Res.* 2016;10:30(1):e78.
41. Mayo CH. Mouth infection as a source of systemic disease. *J Am Med Assoc.* 1914.
42. Molen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003;2:473-88.
43. Montes GS, Junqueira LCU. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991;86:1-11.
44. Mullazehi M, Mathsson L, Lampa J, Rönnelid J. Surface-bound anti-type II collagen-containing immune complexes induce production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, and interleukin-8 from peripheral blood



- monocytes via Fc gamma receptor IIA: a potential pathophysiologic mechanism for humoral anti-type II collagen immunity in arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54(6):1759-71.
45. Nissim A, Winyard PG, Corrigan V, Fatah R, Perrett D, Panayi G, Chernajovsky Y. Generation of neoantigenic epitopes after posttranslational modification of type II collagen by factors present within the inflamed joint. *Arthritis Rheum.* 2005;52(12):3829-38.
  46. Oliveira AA, Martins FM, Furlanetto-Júnior R, Michelin MA, Sousa AP, Nunes PRP, Murta EFC, Chica JEL, Orsatti FL. Rheumatoid arthritis-increased gene expressions in muscle atrophy are restored back to control as a response to acute resistance exercise. *R. bras. Ci. e Mov.* 2018;26(2):24-33.
  47. Olumuyiwa-Akeredolu OO, Pretorius E (2015) Platelet and red blood cell interactions and their role in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2015;35(12):1955–1964.
  48. Park JC, Su C, Jung IH, Choi SH, Cho KS, Kim CK, Park YB, Lee SK, Kim CS. Mechanism of alveolar bone loss in a collagen-induced arthritis model in mice. *J Clin Periodontol.* 2011;38(2):122-30.
  49. Pearson CM, Wood FD. Studies of arthritis and other lesions induced in rats by the injection of mycobacterial adjuvant. *Am. J. Pathol.* 1963;42:93-5.
  50. Pereira RF, de Oliveira da Mota MS, de Lima Coutinho Mattera MS, Tsosura TV, Chiba FY, Garbin CA, Ervolino E, Cintra LT, Okamoto MM, Machado UF, Sumida DH. Periapical lesions decrease Akt serine phosphorylation and plasma membrane GLUT4 content in rat skeletal muscle. *Clin Oral Investig.* 2016 Sep;20(7):1625-30.
  51. Pischon N, Pischon T, Kröger J, Gülmez E, Kleber BM, Bernimoulin JP, Landau H, Brinkmann PG, Schlattmann P, Zernicke J, Buttgerit F, Detert J. Association among rheumatoid arthritis, oral hygiene, and periodontitis. *J Periodontol.* 2008;79(6):979-86.
  52. Pretorius E. The adaptability of red blood cells. *Cardiovasc Diabetol.* 2013;12:63.
  53. Pretorius E, du Plooy JN, Bester J. A comprehensive review on eryptosis. *Cell Physiol Biochem.* 2016;39(5):1977–2000.
  54. Ramamurthy NS, Greenwald RA, Celiker MY, Shi EY. Experimental arthritis in rats induces biomarkers of periodontitis which are ameliorated by gene therapy

- with tissue inhibitor of matrix metalloproteinases. *J Periodontol*. 2005;76(2):229-33.
55. Renvert S, Berglund JS, Persson GR, Söderlin MK. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease in a population-based cross-sectional case-control study. *BMC Rheumatol*. 2020;20:4-31.
  56. Reynolds MA. Modifiable risk factors in periodontitis: at the intersection of aging and disease. *Periodontol 2000*. 2014;64:7-19.
  57. Rittié L. Method for picosirius red-polarization detection of collagen fibers in tissue sections. *Methods Mol Biol*. 2017;1627:395–407. Sakaguchi W, To M, Yamamoto Y, Inaba K, Yakeishi M, Saruta J, Fuchida S, Hamada N, Tsukinoki K. Detection of anti-citrullinated protein antibody (ACPA) in saliva for rheumatoid arthritis using DBA mice infected with *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Oral Biol*. 2019;108:104510
  58. Samborska-Mazur J, Sikorska D, Wyganowska-Świątkowska M. The relationship between periodontal status and rheumatoid arthritis - systematic review. *Reumatologia*. 2020;58(4):236-242.
  59. Santos L, Hall P, Metz C, Bucala R, Morand EF. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids. *Clin Exp Immunol*. 2001;123(2):309-14.
  60. Shandalow SL. Oral focal sepsis in relation to systemic disease. *Dent Cosmos*. 1928;70:609-18.
  61. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010;376:1094-118.
  62. Spiesz EM, Kaminsky W, Zysset PK. A quantitative collagen fibers orientation assessment using birefringence measurements: calibration and application to human osteons. *J Struct Biol*. 2011;176:302–6.
  63. Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2020. <https://www.reumatologia.org.br/>
  64. Tanaka K, Hashizume M, Mihara M, Yoshida H, Suzuki M, Matsumoto Y. Anti-interleukin-6 receptor antibody prevents systemic bone mass loss via reducing the number of osteoclast precursors in bone marrow in a collagen-induced arthritis model. *Clin Exp Immunol*. 2014;175(2):172-80.
  65. Tang Q, Fu H, Qin B, Hu Z, Liu Y, Liang Y, Zhou L, Yang Z, Zhong R. A Possible Link Between Rheumatoid Arthritis and Periodontitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2017;37(1):79-86.

66. Thorbecke GJ, Shah R, Leu CH, Kuruvilla AP, Hardison AM, Palladino MA. Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(16):7375-9.
67. Trombone AP, Claudino M, Colavite P, de Assis GF, Avila-Campos MJ, Silva JS, Campanelli AP, Ibañez OM, De Franco M, Garlet GP. Periodontitis and arthritis interaction in mice involves a shared hyper-inflammatory genotype and functional immunological interferences. *Genes Immun*. 2010;11(6):479-89.
68. Wengner AM, Höpken UE, Petrow PK, Hartmann S, Schurigt U, Bräuer R, Lipp M. CXCR5- and CCR7-dependent lymphoid neogenesis in a murine model of chronic antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(10):3271-83.

## **9- SUPORTE FINANCEIRO**

Apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq). Processo nº 140260/2020-0.

Apoio financeiro do Programa de Internacionalização CAPES PRInt pela bolsa concedida para o Doutorado no exterior com duração de um ano.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Relação bidirecional entre a artrite reumatóide e a periodontite apical"**, Processo FOA nº 0640-2020, sob responsabilidade de Luciano Tavares Angelo Cintra apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 29 de Abril de 2021.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 29 de Abril de 2023.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 29 de Maio de 2023.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Bidirectional relationship between rheumatoid arthritis and apical periodontitis"**, Protocol FOA nº 0640-2020, under the supervision of Luciano Tavares Angelo Cintra presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on April 29, 2021.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** April 29, 2023.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** May 29, 2023.

**Prof. Associado João Carlos Callera**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator

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