

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

SORAIA NETTO

**ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS EM
MODELO ANIMAL DE PERIODONTITE APICAL CRÔNICA INDUZIDA
POR *E. FAECALIS***

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2024

SORAIA NETTO

**ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS EM
MODELO ANIMAL DE PERIODONTITE APICAL CRÔNICA INDUZIDA
POR *E. FAECALIS***

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiana Barichello.
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Jaqueline da Silva Generoso.

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

N476a Netto, Soraia.

Alterações neuroquímicas e comportamentais em modelo animal de periodontite apical crônica induzida por *E. faecalis* / Soraia Netto. - 2024.
73 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2024.

Orientação: Tatiana Barichello.

Coorientação: Jaqueline da Silva Generoso.

1. Periodontite periapical. 2. Periodontite periapical - Efeitos colaterais. 3. *Enterococcus faecalis*. 4. Dano cognitivo. 5. Inflamação. 6. Estresse oxidativo. I. Título.

CDD 23. ed. 617.632

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 609 de 14.03.2019

PARECER

No dia 24 (vinte e quatro) do mês de outubro de 2024, às 08 (oito) horas e 30 (trinta) minutos, na Sala 105/Bloco R1, após o cumprimento legal de conclusão das disciplinas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado), realizaram-se a apresentação e a consequente defesa da tese intitulada: “ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS EM MODELO ANIMAL DE PERIODONTITE APICAL CRÔNICA”, da candidata **Soraia Netto**. A Banca examinadora foi composta pelos(as) professores(as): **Dra. Fabricia Cardoso Petronilho** (Membro Relator – UNESC), **Dra. Josiane Budni** (Membro Interno – UNESC), **Dr. Antônio Augusto Schafer** (Membro Externo – UNESC) e **Dra. Tatiani Bellettini dos Santos** (Membro Externo – Centro Universitário do Espírito Santo). Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca Examinadora, que assim expressou o resultado final da tese:

Trabalho aprovado

Trabalho não aprovado

Observações:

Criciúma, SC, 24 de outubro de 2024.

Documento assinado digitalmente
gov.br FABRICIA CARDOSO PETRONILHO
Data: 03/12/2024 09:58:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. FABRICIA CARDOSO PETRONILHO
Membro Relator – UNESC

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSIANE BUDNI
Data: 03/12/2024 15:03:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. JOSIANE BUDNI
Membro Interno – UNESC

Documento assinado digitalmente
gov.br ANTONIO AUGUSTO SCHAFER
Data: 03/12/2024 10:34:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. ANTÔNIO AUGUSTO SCHAFER
Membro Externo – UNESC

Documento assinado digitalmente
gov.br TATIANI BELLETTINI DOS SANTOS
Data: 03/12/2024 11:25:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. TATIANI BELLETTINI DOS SANTOS
Membro Externo – Centro Universitário do Espírito Santo

TATIANA
BARICHELLO:57534314968
Assinado de forma digital por
TATIANA BARICHELLO:57534314968
Dados: 2024.12.02 15:59:34 -03'00'

Prof. Dra. TATIANA BARICHELLO
Orientador(a)

Prof. Dra. SAMIRA DA SILVA VALVASSORI
Coordenadora Adjunta do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiopatologia Experimental e Laboratório de Neurologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Dedico esta tese aos meus pais, ao meu marido e a minha filha, que sempre me incentivaram nas conquistas profissionais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida, me guiando, nos momentos mais difíceis.

À Prof. Dra. Tatiana Barichello, pela orientação desta Tese, mesmo de longe acompanhou e supervisionou todas as etapas deste trabalho. Obrigada por participar do seu grupo de pesquisa.

À Jaqueline da Silva Generoso, minha coorientadora. Obrigada pela paciência, dedicação, disponibilidade, companheirismo e amizade.

A todos os alunos do Laboratório de Fisiopatologia Experimental, que participaram na realização deste trabalho.

A todos os professores do PPGCS, que tanto colaboraram para os meus conhecimentos na área da saúde.

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio.

À minha filha; Amanda Netto Manique Barreto e ao meu marido Moacir Manique Barreto pela compreensão.

A todos, muito obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças à Deus, não sou o que era antes”.
Marthin Luther King

RESUMO

A periodontite apical (PA) é uma infecção inflamatória crônica oral, que na maioria dos casos resulta da cárie dentária, traumatismo dental e da periodontite crônica. Após a contaminação da polpa dental pelas bactérias presentes na cavidade oral, a polpa inflamada acaba necrosando. Este processo inflamatório induz a produção de mediadores inflamatórios que chegam à circulação sanguínea e podem contribuir para o agravamento de diversas doenças sistêmicas. Há evidências crescentes de que a inflamação desempenha um papel fundamental na fisiopatologia de doenças que afetam o sistema nervoso central. Embora a inflamação esteja presente em ambas as condições, os mecanismos exatos e as ligações cruzadas entre a PA e neuroinflamação são poucos conhecidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a PA induzida e contaminada com *Enterococcus faecalis* pode causar neuroinflamação, alterações nos parâmetros de estresse oxidativo e alterações cognitivas em modelo experimental. Foram utilizados 100 ratos Wistar machos adultos (60 dias, 250-300 g), onde foi induzida a PA. Os animais foram divididos em grupo controle/ salina (n=25); controle/ *E. faecalis* (n=25); PA/ salina (n=25); PA/ *E. faecalis* (n=25). Após o experimento os animais retornaram para o biotério em suas caixas moradias. No 10º dia após a indução da lesão, foram realizados o teste comportamental de reconhecimento de objetos novos além da tomografia computadorizada de mandíbula. No 21º dia foi realizado novamente o teste comportamental e após a eutanásia, foi realizada coleta de amostras de córtex frontal, hipocampo e líquido cefalorraquidiano, para análises imunológicas e imunohistoquímicas. Neste estudo foi possível verificar que em 21 dias após o desenvolvimento de PA os animais apresentaram danos nas estruturas ósseas dentárias, características da doença, sendo os animais do grupo PA/ *E. faecalis* mais afetados e com maiores volumes de lesão. Os animais dos grupos periodontite apresentaram dano de memória, com aumento expressivo de marcadores gliais nas estruturas córtex frontal, giro denteado e hipocampo, nos animais infectados por *E. faecalis*. Os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 estiveram exacerbados nos grupos PA/ *E. faecalis* quando comparado ao grupo PA/ salina. Com relação aos níveis de IL-10 não foi observado alterações significativas em nenhuma estrutura avaliada. Na avaliação de parâmetros oxidativos, verificou-se aumento expressivo de peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e aumento de espécies reativas de oxigênio no grupo PA/ *E. faecalis*. Sendo assim, o processo infeccioso por *E. faecalis* exacerba parâmetros inflamatórios e oxidativos em modelo animal de PA, resultando em ativação microglial e possível dano cerebral correlacionadas a danos comportamentais de memória e aprendizado.

Palavras chaves: Periodontite apical; *Enterococcus faecalis*; dano cognitivo; inflamação.

ABSTRACT

Apical periodontitis (AP) is a chronic oral inflammatory infection that in most cases results from dental caries, dental trauma and chronic periodontitis. After contamination of the dental pulp by bacteria present in the oral cavity, the inflamed pulp ends up necrosing. This inflammatory process induces the production of inflammatory mediators that reach the bloodstream and can contribute to the worsening of several systemic diseases. There is increasing evidence that inflammation plays a key role in the pathophysiology of diseases that affect the central nervous system. Although inflammation is present in both conditions, the exact mechanisms and cross-links between AP and neuroinflammation are poorly understood. The aim of this study was to evaluate whether AP induced and contaminated with *Enterococcus faecalis* can cause neuroinflammation, changes in oxidative stress parameters and cognitive alterations in an experimental model. 100 adult male Wistar rats (60 days, 250-300 g) were used, in which AP was induced. The animals were divided into control/saline (n=25); control/ *E. faecalis* (n=25); PA/saline (n=25); PA/ *E. faecalis* (n=25) groups. After the experiment, the animals were returned to the vivarium in their housing boxes. On the 10th day after the induction of the lesion, the behavioral test of recognition of novel objects was performed in addition to the computed tomography of the jaw. On the 21st day, the behavioral test was performed again and after euthanasia, samples of frontal cortex, hippocampus and cerebrospinal fluid were collected for immunochemical and immunohistochemical analyses. In this study, it was possible to verify that 21 days after the development of PA, the animals presented damage in the dental bone structures, characteristic of the disease, with the animals in the PA/ *E. faecalis* group being more affected and with larger lesion volumes. Animals in the periodontitis groups showed memory impairment, with a significant increase in glial markers in the frontal cortex, dentate gyrus and hippocampus structures in animals infected with *E. faecalis*. The levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 were exacerbated in the PA/ *E. faecalis* groups when compared to the PA/ saline group. Regarding the levels of IL-10, no significant changes were observed in any structure evaluated. In the evaluation of oxidative parameters, a significant increase in lipid peroxidation, protein carbonylation and an increase in reactive oxygen species were observed in the PA/ *E. faecalis* group. Therefore, the infectious process by *E. faecalis* exacerbates inflammatory and oxidative parameters in an animal model of PA, resulting in microglial activation and possible brain damage correlated with behavioral impairments in memory and learning.

Keywords: Apical periodontitis; *Enterococcus faecalis*; cognitive damage; inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1: Processo inflamatório crônico na PA e processo inflamatório agudo na pulpíte irreversível. | 20 |
| Figura 2. Efeitos do <i>Enterococcus faecalis</i> em macrófagos..... | 24 |
| Figura 3: Representação do protocolo experimental..... | 30 |
| Figura 4: Aparato para avaliação do teste comportamental de reconhecimento de objetos..... | 31 |
| Figura 5: Imagem de TCFC do modelo animal - grupo controle/ salina com 10 dias após indução da PA. | 36 |
| Figura 6: Imagem de TCFC do modelo animal - grupo controle/ E. Faecalis com 10 dias após indução da PA..... | 37 |
| Figura 7: Imagem de TCFC do modelo animal - PA/ salina com 10 dias após indução da PA. | 37 |
| Figura 8: Imagem de TCFC do modelo animal - grupo PA/ E. Faecalis com 10 dias após indução da PA. | 38 |
| Figura 9: Imagem de TCFC do modelo animal - grupo controle/ salina em 21 dias após indução da PA..... | 35 |
| Figura 10: Imagem de TCFC do modelo animal - grupo controle/ E. faecalis em 21 dias após indução da PA..... | 36 |
| Figura 11: Imagem de TCFC do modelo animal - grupo PA/ salina em 21 dias após indução da PA..... | 39 |
| Figura 12: Imagem de TCFC do modelo animal - grupo PA/ E. Faecalis em 21 dias após indução da PA. | 40 |
| Figura 13: Dimensões das lesões avaliadas por TCFC. | 40 |
| Figura 14: Volume das lesões de periodontites apicais. | 41 |
| Figura 15: Teste de reconhecimento de novos objetos em ratos Wistar adultos 10 e 21 dias após indução de PA..... | 42 |
| Figura 16. Marcadores de ativação astrocitário e microglial. | 44 |
| Figura 17. Níveis de TNF- α em regiões cerebrais..... | 44 |
| Figura 18. Níveis de IL-1 β em regiões cerebrais..... | 44 |
| Figura 19. Níveis de IL-6 em regiões cerebrais..... | 44 |
| Figura 20. Níveis de IL-10 em regiões cerebrais..... | 45 |
| Figura 21. Níveis de peroxidação lipídica..... | 49 |

| | |
|---|----|
| Figura 22. Níveis de carbonilação de proteínas..... | 49 |
| Figura 23. Níveis de EROs avaliados por DCFH..... | 50 |
| Figura 24. Atividade de SOD e CAT..... | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT - Catalase

CEUA - Comissão de ética no uso de animais;

CONCEA - Conselho nacional de controle de experimentação animal;

DCF-DA - diacetato de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína;

DCFH - 2',7'-diclorofluoresceína;

EROs - Espécies reativas de oxigênio;

FOV - Campo de visão (do inglês *field of view*);

GFAP - Proteína ácida fibrilar glial (do inglês *glial fibrillary acidic protein*)

GSH-Px - Glutathione peroxidase;

IBA-1 - Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (do inglês *ionized calcium-binding adaptor molecule 1*);

IL – Interleucina;

LCR – Líquido cefalorraquidiano;

LTA - Ácido lipoteicoico (do inglês *Lipoteichoic acid*);

MDA – Malondialdeído;

NF-κB - Fator nuclear kappa B (do inglês *The Nuclear Factor NF-κB*);

PA – Periodontite apical;

PAR - Periodontite apical refratária;

PBS - Solução salina tamponada com fosfato (do inglês *Phosphate-buffered salina*);

PGN – Peptidoglicano;

RGS10 - regulador da sinalização da proteína G 10 (do inglês *Regulator Of G Protein Signaling 10*)

SOD - Superóxido dismutase;

SPE - Substâncias poliméricas extracelulares;

SCN – Sistema nervoso central;

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *thiobarbituric acid reactive species*);

TCFC - Tomografia computadorizada de feixe cônico;

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.2. BIOFILME ORAL NA PERIODONTITE APICAL | 19 |
| 1.3. ENTEROCOCCUS FAECALIS | 22 |
| 1.4. JUSTIFICATIVA | 25 |
| 2. Objetivos | 27 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | 27 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 27 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 3.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA | 28 |
| 3.2. ANIMAIS | 28 |
| 3.3. PREPARAÇÃO DO MICRORGANISMO INFECTANTE | 28 |
| 3.4. MODELO DE LESÃO PERIAPICAL | 29 |
| 3.5. DESENHO EXPERIMENTAL | 30 |
| 3.6. TESTE COMPORTAMENTAL | 30 |
| 3.6.1. Reconhecimento de objetos novos | 31 |
| 3.7. TOMOGRAFIA DA PA | 31 |
| 3.8. IMUNOHISTOQUIMICA | 32 |
| 3.9. NÍVEIS DE CITOCINAS | 33 |
| 3.10. AVALIAÇÃO DO DANO OXIDATIVO | 33 |
| 3.10.1. Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) | 33 |
| 3.10.2. Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil | 33 |
| 3.10.3. Atividade oxidativa - DCFH | 34 |
| 3.10.4. Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) | 34 |
| 3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 34 |
| 3.12. DESCARTE DOS MODELOS ANIMAIS | 34 |
| 4. RESULTADOS | 36 |
| 4.1. TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DE FEIXE CÔNICO (TCFC) EM 10 E 21 DIAS APÓS INDUÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL | 36 |
| 4.2. TESTE COMPORTAMENTAL | 41 |
| 4.3. ATIVAÇÃO ASTROCITÁRIA E MICROGLIAL | 43 |
| 4.4. CITOCINAS | 45 |
| 4.4.1. NÍVEIS DE TNF- α | 45 |
| 4.4.2. NÍVEIS DE IL-1 β | 46 |
| 4.4.3. NÍVEIS DE IL-6 | 47 |
| 4.4.4. NÍVEIS DE IL-10 | 48 |

| | |
|--|----|
| 4.5. DANO OXIDATIVO | 48 |
| 4.5.1. NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA - TBARS..... | 48 |
| 4.5.2. CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS..... | 49 |
| 4.5.3. PRODUÇÃO DE EROs - DCFH | 50 |
| 4.5.4. ATIVIDADE DA SOD E CAT | 50 |
| 5. DISCUSSÃO | 52 |
| 6. CONCLUSÃO | 61 |
| REFERÊNCIAS..... | 62 |
| ANEXO A – Certificado de aprovação CEUA | 72 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONCEITUAÇÃO E TRATAMENTO DA PA

1.1.1. Conceito

A PA é uma lesão inflamatória dos tecidos perirradiculares que surge principalmente devido à saída de irritantes pelo forame apical, como bactérias e toxinas de uma polpa inflamada ou necrótica, levando à destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar (Naruse, Itoh, Itoh *et al.* 2021). Geralmente é causada pela infecção irreversível da polpa por diferentes microrganismos que levam à necrose pulpar. Na ponta da raiz, ocorre a quebra dos tecidos envolvidos (ligamento periodontal, cemento e osso), na tentativa da defesa imunológica do hospedeiro de localizar a infecção e impedir a propagação (Georgiou, Cornejo Ulloa, Van Kessel *et al.* 2021).

Uma recente revisão sistemática comparando estudos de 2012 a 2020 constatou que houve um aumento da prevalência de PA na população geral adulta em comparação com os dados de 2012 (6,3% versus 5,4%) em dentes tratados endodonticamente (41,3% versus 35,9%) e não tratados (3,5% versus 2,1%) (Jakovljevic, Nikolic, Jacimovic *et al.* 2020). O tratamento endodôntico tem por objetivo diminuir ao máximo a carga bacteriana, resultando no desaparecimento da lesão com neoformação óssea perirradicular. Em 85% dos casos clínicos de PAs obtém-se sucesso através do tratamento endodôntico (Howait, Albassam, Yamada *et al.* 2019). As PAs são muito prevalentes mundialmente, em média 34 a 65% dos indivíduos já foram acometidos por esta patologia, sendo que 24 a 65% destas podem ser observadas radiograficamente (Howait, Albassam, Yamada *et al.* 2019, Tibúrcio-Machado, Michelon, Zanatta *et al.* 2021). Porém, estas lesões podem persistir após o tratamento endodôntico, nos casos em que a abertura de acesso for insuficiente, quando o protocolo endodôntico não atinge todos os canais, ou seja, quando não receberam a instrumentação adequada e quando a restauração temporária ou definitiva não fornece uma blindagem adequada (El Ouarti, Chala, Sakout *et al.* 2021).

Os agentes microbianos e seus produtos quando alcançam o ambiente endodôntico, desencadeiam uma resposta inflamatória que pode levar à formação de uma lesão osteolítica na região apical, causada pela resposta imune à infecção

endodôntica (Barcelos, Rosa, Roversi *et al.* 2020). A função desta reação inflamatória é conter as bactérias do canal radicular e prevenir a propagação da infecção, embora a grande maioria dos casos seja assintomática, as exacerbações da PA podem se apresentar como PA sintomática e causar dor e edema no dente afetado (Cope, Francis, Wood *et al.* 2014, Galler, Weber, Korkmaz *et al.* 2021). Aproximadamente 34% destas lesões estão associadas a cáries profundas, indicando uma relação existente entre bactérias, cárie dental e lesões periapicais (Lin, Xing, Qin *et al.* 2017, Ali, Thani, Foschi *et al.* 2020).

Na ocorrência de uma cavidade de cárie profunda, as bactérias presentes na cavidade oral, contaminam a polpa dental levando a necrose pulpar. Neste contexto, as lesões periapicais resultam do encontro entre as bactérias presentes no sistema de canais radiculares e as células imunes do hospedeiro (Georgiou, Crielaard, Armenis *et al.* 2019).

1.1.2. Tratamento das PA

A formação de PA é a resposta do organismo à infecção presente no sistema de canais radiculares durante a inflamação crônica. Depois que o tecido pulpar perde seu suprimento sanguíneo é totalmente colonizado pelas bactérias e como consequência deste processo, ocorre a formação da patologia perirradicular (Khandelwal, Janani, Teja *et al.* 2022).

Em aproximadamente 4 a 15% destes tratamentos podem ocorrer insucesso, mantendo uma inflamação persistente. Este fato se deve à permanência de bactérias no interior do canal radicular e o patógeno mais comumente encontrado é *E. faecalis* (Vieira, Pérez, Alves *et al.* 2020). Esta bactéria possui uma variedade de fatores de virulência, incluindo citolisina, proteína de adesão, gelatinase e ácido lipoteicóico (LTA). O LTA apresenta uma forte imunogenicidade e é o principal fator de virulência que leva à inflamação periapical (Yin, Liu, Dong *et al.* 2020, Siqueira, Rôças 2022, Park, Ha, Sim *et al.* 2023)

Em condições de homeostase ocorre a neoformação óssea por ação dos osteoblastos e reabsorção pelos osteoclastos. Quando acontece um processo inflamatório crônico, a atividade osteoblástica é inibida e a osteoclástica aumentada. A ativação da resposta imune ocorrerá por tempo indeterminado, fazendo com que a

capacidade de neoformação seja reduzida significativamente, aumentando gradualmente a área de destruição óssea (Wang, Jin, Ao *et al.* 2019).

Os osteoclastos são derivados da linhagem de monócitos entre eles os macrófagos e são reconhecidos como o único tipo de célula capaz de reabsorver osso. Os osteoblastos e seu precursor, as células mesenquimais derivadas da medula óssea, não apenas direcionam o processo de formação óssea, mas também desempenham um papel fundamental na osteogênese (Xiao, Zhou, Zhu *et al.* 2018, Omi, Mishina 2022).

As lesões inflamatórias são geralmente hipóxicas, devido aos danos vasculares, ao metabolismo das bactérias e pelo grande número de células inflamatórias envolvidas no local. Muitas das respostas celulares à hipóxia, são mediadas pela produção de EROs (Tang, Zhou, Gao *et al.* 2014, Park, Kim, So *et al.* 2021). A hipóxia desempenha papéis patogênicos no desenvolvimento de lesões periapicais, que envolvem a sinalização do fator 1 induzível por hipóxia e do fator de crescimento endotelial vascular, potencialmente derivado de neutrófilos (Virtej, Papadakou, Sasaki *et al.* 2016, Huang, Wang, Lin *et al.* 2018)

Diversas citocinas pró-inflamatórias são produzidas localmente para mediar a resposta imune durante o processo inflamatório na região periapical, sendo mediados pela via do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que demonstrou-se estar em níveis baixos em indivíduos saudáveis. Além disso, em modelo animal de PA em ratos confirmou a correlação positiva entre a via de sinalização NF- κ B e a progressão da PA (Guan, He, Wei *et al.* 2021). Um estudo recente com modelo animal de PA demonstrou que a regulação positiva do NF- κ B exacerba a destruição óssea alveolar em lesões de PA, sendo o regulador da sinalização da proteína G 10 (RGS10) responsável por regular negativamente a sinalização pró-inflamatória (Wei, Li, Liu *et al.* 2022). A PA pode causar efeitos adversos, incluindo dor, perda de suporte ósseo e perda do dente. Estudos são realizados para avaliar as consequências da PA, uma vez que é um foco de infecção local. No entanto, está conectado com todo sistema corpóreo através dos vasos sanguíneos (Cintra, Estrela, Azuma *et al.* 2018, Yang, Shen, Zhang *et al.* 2023).

Estima-se que metade da população mundial tenha pelo menos um dente acometido com PA. Por essa lesão ser extremamente comum, historicamente, estudos têm sido realizados para avaliar os possíveis impactos sistêmicos que a PA pode causar no indivíduo (Barcelos, Rosa, Roversi *et al.* 2020).

1.2. BIOFILME ORAL NA PERIODONTITE APICAL

Os biofilmes são definidos como colônias de microrganismos, nos quais as bactérias estão inseridas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) aderidas umas às outras e/ ou a uma superfície. Esta matriz SPE, não apenas fornece suporte para que as células possam aderir-se, mas também cria um microambiente onde existe a disponibilidade de vários nutrientes para estas bactérias (Jiao, Tay, Niu *et al.* 2019, Karygianni, Ren, Koo *et al.* 2020).

O microbioma oral é o termo geral usado para descrever as bactérias, fungos e vírus que colonizam a cavidade oral e incluem as bactérias, microrganismos patogênicos e probióticos. A homeostase do microbioma oral desempenha um papel crucial na manutenção da saúde. Quando ocorre desequilíbrio, os patógenos predominantes podem causar uma variedade de doenças infecciosas orais, incluindo periodontite, cárie, infecções pulpares e periapicais e mucosite oral (Jiang, Deng, Dai *et al.* 2021, Li, Liu, Yang *et al.* 2022).

A formação de biofilmes nas superfícies dentais ou sobre materiais odontológicos, tem sido reconhecido como importantes mediadores para o desenvolvimento de muitas doenças infecciosas bucais, incluindo cárie dentária, as doenças periodontais crônicas e infecções endodônticas (Lukic, Karygianni, Flury *et al.* 2020). Os biofilmes protegem as células bacterianas dos mecanismos de defesa do hospedeiro e dos antimicrobianos liberados pelo hospedeiro e são capazes de disseminar bactérias planctônicas, podendo causar doenças agudas nos dentes e nos tecidos adjacentes, incluindo cárie, gengivite, periodontite, perimplantite e pulpite (Lukic, Karygianni, Flury *et al.* 2020).

As bactérias Gram-positivas dominam a microflora nas lesões de cárie iniciais e moderadas, enquanto as lesões vão se tornando mais profundas aumentam a proporção de bactérias anaeróbicas Gram-negativas ocorrendo de forma inevitável a infiltração da polpa dentária com células inflamatórias. Desta maneira os microrganismos começam a invadir a polpa, ocorre a destruição da camada de odontoblastos e os fibroblastos pulpares subjacentes são ativados e participam da resposta do hospedeiro (Poornima, Ravishankar, Abbott *et al.* 2021).

Após o contato das bactérias orais com o tecido pulpar através de cáries profundas, traumatismo dental, bolsas periodontais ou exposição pulpar acidental

causado por iatrogenia, inicia-se um processo inflamatório, na tentativa de impedir a progressão da contaminação pulpar (Careddu ,Duncan 2021). Como consequência deste processo de contaminação, a polpa pode perder sua vitalidade devido à penetração de microrganismos e diversos componentes microbianos através dos túbulos dentinários e disseminar a infecção para os tecidos adjacentes, resultando em osteonecrose, osteomielite ou infecções endodônticas disseminadas e como resultado deste processo inflamatório, uma periondontite apical (PA) se desenvolve associada ao ápice radicular (figura 1) (Larsen ,Fiehn 2017).

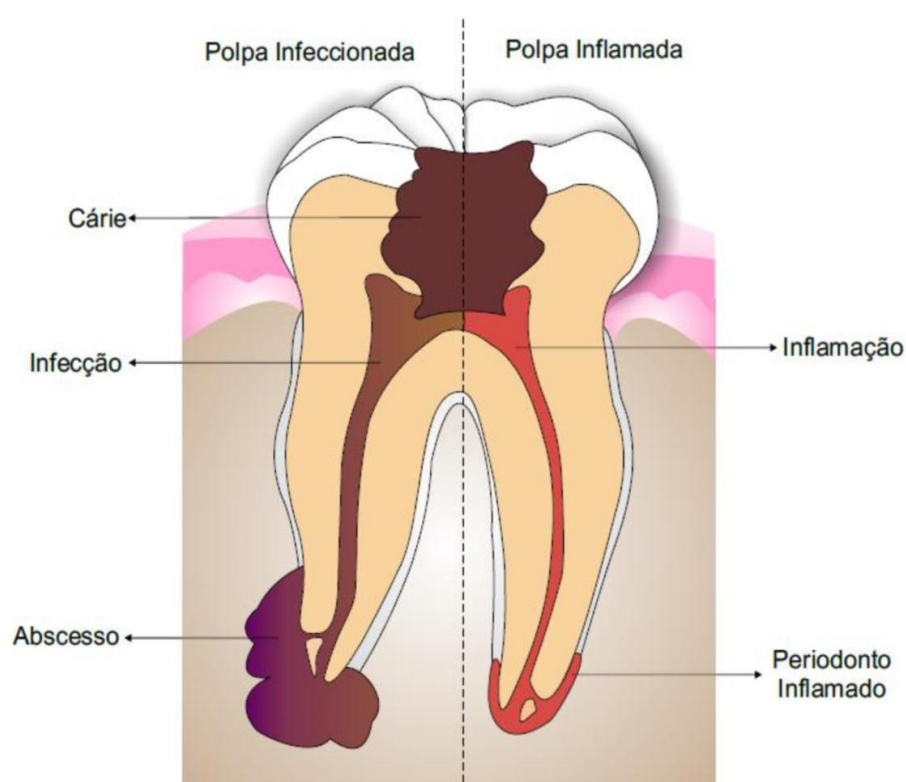


Figura 1: Processo inflamatório crônico na PA e processo inflamatório agudo na pulpíte irreversível. A contaminação da polpa pode desencadear a perda de sua vitalidade e favorecer o crescimento e penetração de microrganismos e componentes microbianos nos túbulos dentinários. A disseminação da infecção para tecidos adjacentes resulta em osteonecrose, osteomielite ou infecções endodônticas disseminadas resultando em PA. Figura elaborada pelo autor.

O biofilme encontrado no início dos canais radiculares é composto principalmente por bactérias relacionadas à cárie. No entanto, após a invasão do sistema de canais, através dos túbulos dentinários, há alterações na composição deste biofilme, caracterizado pela dominância de bastonetes anaeróbios Gram-

negativos e bactérias proteolíticas (Antunes, Rôças, Alves *et al.* 2015, Li, Wang, Bao *et al.* 2023).

A flora intracanal madura consiste em cocos, bastonetes, organismos filamentosos e espiroquetas, formando aglomerados nas paredes dentinárias do canal radicular. Os biofilmes intrarradiculares presentes nas PAs podem ser encontrados no ápice dos canais radiculares, ramificações, istmos, nas paredes dentinárias e na superfície externa da raiz. Estes se aderem ao colágeno não mineralizado na superfície dos túbulos dentinários, constroem um biofilme resistente que podem persistir mesmo em canais radiculares tratados (Rodrigues, de Andrade, de Vasconcelos *et al.* 2018, Lukic, Karygianni, Flury *et al.* 2020).

Várias espécies bacterianas são relatadas na infecção endodôntica primária que ocorre em canais radiculares que não foram manipulados e é tipicamente de natureza polimicrobiana, com bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, com predominância de anaeróbios obrigatórios. Recentemente uma diversidade microbiana significativamente maior foi demonstrada em infecções sintomáticas do que em infecções assintomáticas, especialmente entre indivíduos com doenças sistêmicas associadas (Abusrewil, Alshanta, Albashaireh *et al.* 2020).

As infecções intrarradiculares primárias são causadas por bastonetes anaeróbios Gram-negativos como *Prevotella* sp. e *Porphyromonas* sp., o patógeno periodontal *Tannerella forsythia*, *Asaccharolytic*, *Dialister* sp., *Fusobacterium* sp. e bactérias Gram-negativas com flagelos periplasmáticos como *Treponema* sp. Além disso, as infecções primárias também compreendem bastonetes anaeróbios Gram-positivos, cocos Gram-positivos que podem persistir no tratamento endodôntico (*Parvimonas micra*, *Streptococcus* sp., *Enterococcus faecalis*), bastonetes microaerofílicos Gram-negativos (*Campylobacter* sp.) além de fungos e vírus (Neelakantan, Romero, Vera *et al.* 2017).

As infecções secundárias podem ser causadas por reinfecção, infecção remanescente ou infecção recorrente em dentes com canal previamente tratados (Costa, Pacheco-Yanes, Siqueira *et al.* 2019). As infecções secundárias são o foco deste estudo e são caracterizadas pela persistência de enterococos, estreptococos, lactobacilos, Actinomyces, fungos, *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides* e *Dialister* sp. Estes microrganismos foram encontrados em infecções endodônticas assintomáticas associadas a PA crônica. Enquanto os anaeróbios obrigatórios, como *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *Dialister pneumosinte* foram encontrados em infecções sintomáticas

cl clinicamente diagnosticadas como abscessos agudos (Vieira, Pérez, Alves *et al.* 2020).

O *E. faecalis* é considerado o principal patógeno causador das PAs persistentes, prevalente em cerca de 77% dos processos infecciosos, responsável pela destruição do osso alveolar e formação de tecido de granulação inflamatório no interior da lesão na região apical (Dai, Ma, Jiang *et al.* 2022, Tang, Zhang, Mei *et al.* 2022).

1.3. ENTEROCOCCUS FAECALIS

O *E. faecalis* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, cocos catalase-negativo, comumente encontrada na água, no solo, nos alimentos e no trato gastrointestinal humano sendo o principal agente de infecções associadas aos cuidados de saúde, incluindo infecções de feridas, infecção do trato urinário, enterite hemorrágica e intoxicação alimentar (Oh, Hwang, Hong *et al.* 2021). Esse microrganismo possui características comensais, sendo encontrados em muitos nichos do corpo humano, como a cavidade oral e a mucosa gastrointestinal. Os enterococos apresentam multirresistência a diversos medicamentos e irrigantes de uso endodôntico e foram isoladas em canais radiculares infectados em cultura pura ou associadas a outras bactérias em 5 a 20% dos casos e demonstrado que podem colonizar os canais radiculares e persistir mesmo após o tratamento químico e mecânico realizado durante uma endodontia (Fiallos, Ribeiro Aguiar, da Silva *et al.* 2022).

É também um patógeno oportunista prolífico, que causa infecções associadas ao biofilme, como nos canais radiculares infectados tratados e não tratados, na endocardite bacteriana e infecções de próteses articulares e é frequentemente isolado de locais de infecção polimicrobiana, como são as do trato urinário, queimaduras e úlceras do pé diabético (Gholizadeh, Aghazadeh, Ghotaslou *et al.* 2021).

Dentro dos biofilmes as *E. faecalis* secretam substâncias poliméricas extracelulares e interagem entre si, resultando em características diferenciais entre estas bactérias e as planctônicas, especialmente no que se refere a resistência aos antibióticos. Sendo que, estes medicamentos não são eficazes para eliminar as bactérias dentro do biofilme organizado (Willett, Dale, Kwiatkowski *et al.* 2021).

O *E. faecalis* possui a capacidade de resistir aos estresses ambientais e desenvolver biofilmes resistentes em dispositivos médicos e tecidos do hospedeiro prejudicando o sistema imunológico, tornando as infecções enterocócicas comuns e difíceis de erradicar (Kundra, Lam, Kajfasz *et al.* 2021). Além disso, são as bactérias mais predominantes em infecções endodônticas persistentes e podem sobreviver em condições ambientais adversas, como baixa alcalinidade e necrose pulpar (Tüfenkçi, Yılmaz 2020).

O tratamento indicado para os casos de PA crônica é o tratamento endodôntico, onde a remoção dessa bactéria ocorre através da instrumentação e pelo uso de substâncias químicas utilizadas no interior do canal radicular. Devido à capacidade destas bactérias de formar biofilmes, de penetrar nos túbulos dentinários e de resistir a vários antimicrobianos, o tratamento pode resultar em insucesso em alguns casos (Lu, Zhang, Huang *et al.* 2015, Xia, Zhuo, Ren *et al.* 2022). As causas de insucesso do tratamento se devem principalmente pela infecção por *E. faecalis* afetar cerca de 40% dos pacientes infectados, onde ocorre a persistência da destruição do osso alveolar e formação de tecido de granulação inflamatório no interior da lesão na região apical. Estas bactérias e seus produtos tóxicos são os principais fatores etiológicos da PA persistente ou refratária (Dong, Jin, Zuo *et al.* 2019, Tang, Zhang, Mei *et al.* 2022).

Esse microrganismo é considerado o principal patógeno causador das PAs persistentes, com valores de prevalência chegando a 77%, onde as infecções endodônticas não regridem após o tratamento. Possui vários fatores de virulência, contendo ácido lipoteicóico (LTA), peptidoglicano (PGN), substância agregadora, citolisina e enzimas líticas, que podem invadir os túbulos dentinários, formar biofilmes, tolerar ambientes oligotróficos e possuir forte resistência à desinfecção mecânica e química (Dai, Ma, Jiang *et al.* 2022).

O *E. faecalis* possui uma alta capacidade invasiva e de sobrevivência no interior do tecido hospedeiro, por intermédio de destruição direta ou através do desencadeamento de funções fisiológicas das células imunes, induzindo respostas imunes incapazes de eliminar bactérias, além de estimular um ambiente danoso oxidativo, com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), conforme elucidado na figura 2 (Elashiry, Bergeron, Tay 2023).

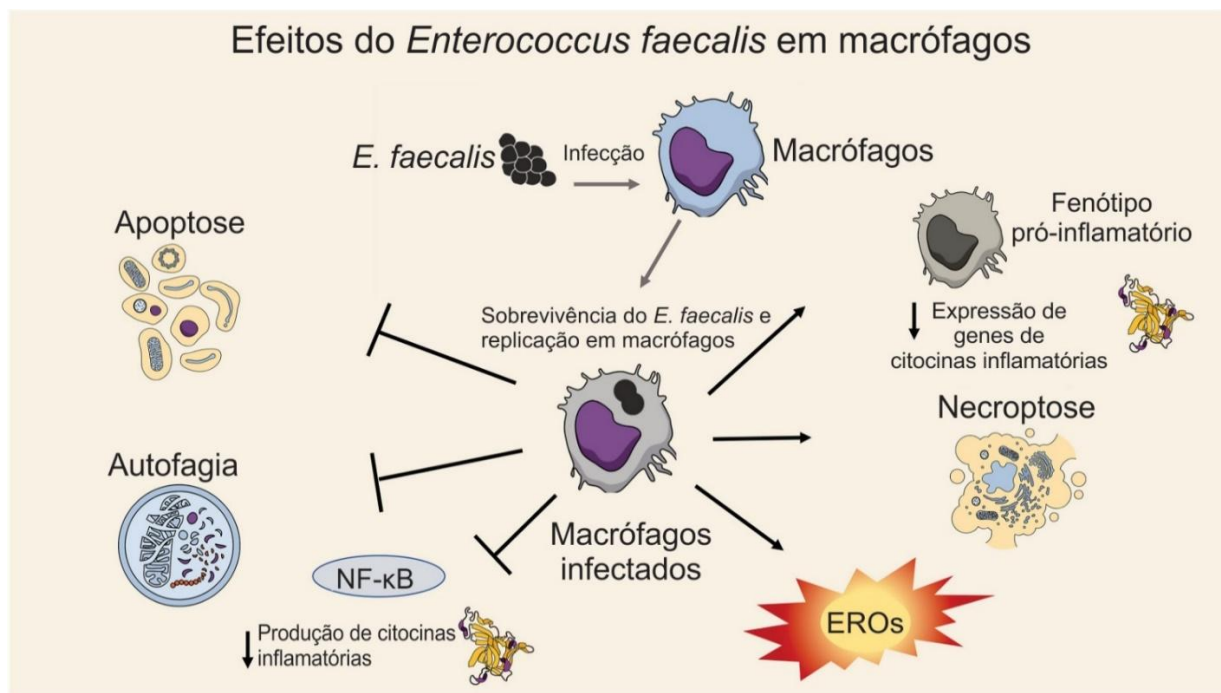


Figura 2. Efeitos do *E. faecalis* em macrófagos. O diagrama esquemático mostrando como a *E. faecalis* afeta o macrófago para sobreviver dentro da célula e escapar da morte. Ao infectar os macrófagos o *E. faecalis* pode atuar na diminuição da apoptose celular, autofagia e produção de citocinas pró-inflamatórias, além de induzir respostas imunes incapazes de eliminar bactérias, e estimular um ambiente danoso oxidativo, com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). NF-κB; fator nuclear kappa B, EROs: Espécies reativas de oxigênio. Figura/ Ilustração elaborada pelo auto. Adaptado de (Elashiry, Bergeron ,Tay 2023).

Devido à persistência da infecção por estas bactérias, podem acontecer episódios de agudização do processo inflamatório com sintomatologia dolorosa, edema e destruição óssea envolvendo os tecidos adjacentes como, cemento, ligamento periodontal e osso alveolar (Dong, Jin, Zuo *et al.* 2019, Wang, Zhang, Dong *et al.* 2019). Além disso a PA é reconhecida como um fator de risco para o desenvolvimento da Doença de Alzheimer. Dessa forma uma inflamação sistêmica de origem bucal, pode induzir ou exacerbar uma neuroinflamação (Kantarci, Tognoni, Yaghmoor *et al.* 2020).

As infecções e inflamações em regiões periféricas do corpo, podem agravar a inflamação no cérebro e desempenhar um papel importante na patogênese da neurodegeneração e neuroinflamação (Chen, Wu ,Chang 2017, Maitre, Mahalli, Micheneau *et al.* 2021, Dziedzic 2022). A ocorrência de doenças crônicas sistêmicas e sua associação com doenças crônicas bucais está bem estabelecida na literatura, sendo verificado em doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, infecções respiratórias, parto prematuro e baixo peso ao nascer assim

como, infecções do trato gastrointestinal (Tzeng, Chung, Yeh *et al.* 2016, Hajishengallis, Chavakis 2021).

Essa associação se deve ao aumento da inflamação sistêmica que acompanha o crescimento de microrganismos patogênicos relacionado a doenças crônicas bucais (Chen, Wu, Chang 2017, Zhao, Li, Su *et al.* 2020). Estudos demonstraram que a PA, principalmente nos estágios graves, tem potencial para desencadear um estágio de estresse pró-inflamatório e pró-oxidativo sistêmico, o capaz de reduzir a capacidade antioxidante do organismo (Kanzaki, Wada, Narimiya *et al.* 2017). Localmente, esses patógenos liberam citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β . A nível cerebral, os astrócitos são recrutados e uma vez ativados, contribuem para liberação de mediadores inflamatórios além de produzirem apolipoproteína E (ApoE), que pode estar envolvida na fibrilação da Tau. Como os processos inflamatórios perduram por meses ou anos, este ciclo de liberação contínua de citocinas pró inflamatórias e β A exacerbam o dano neuronal (Shoemark, Allen 2015, Leblhuber, Ehrlich, Steiner *et al.* 2021).

E. faecalis é um patógeno amplamente utilizado em modelos experimentais de infecção para pesquisa sobre a patogênese subjacente da PA. A interferência nas respostas das células hospedeiras moduladas por *E. faecalis* pode ajudar a tratar a PA, bem como compreender o processo fisiopatológico da doença (Deng, Lin, Liu *et al.* 2023).

1.4. JUSTIFICATIVA

A PA é consequência de processos inflamatórios crônicos, desencadeados por uma infecção bacteriana do microambiente pulpar e endodôntico, associado a procedimentos endodônticos com insucesso. Devido a prevalência de *E. faecalis* em PAs persistentes e o aumento de citocinas inflamatórias no local da inflamação, suspeita-se que estas bactérias podem agravar e causar inflamação sistêmica, além de degradação tecidual em outros órgãos e tecidos. Evidências sugerem que a indução de PA pode alterar mediadores neuroinflamatórios levando a alterações comportamentais. Em modelos animais *in vivo* foi demonstrado que sua natureza inflamatória local pode levar a inflamação periférica e ativação de células imunes cerebrais, com consequente neuroinflamação, culminando em danos cognitivos e neuropsiquiátricos. A resposta

ao estresse inflamatório e eventos negativos, desregula o sistema imune e seu controle sobre o crescimento de microrganismos patogênicos.

Sendo assim, a PA e o *E. faecalis* tornaram-se objetivos de estudos e discussões na comunidade científica sobre seu papel nas alterações do sistema nervoso central (SNC), em que uma resposta inflamatória localizada decorrente da infecção bacteriana causa liberação de mediadores inflamatórios na circulação sistêmica, afetando o cérebro e exercendo efeitos deletérios. No entanto, a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos é limitada e pouco se sabe sobre o assunto, sendo necessário mais pesquisas na área.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar se a PA induzida e contaminada com *E. faecalis* pode resultar em alterações inflamatórias e oxidativas, além de alterações cognitivas em modelo experimental com ratos Wistar adultos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-10 no hipocampo, córtex frontal e LCR de ratos Wistar adultos submetidos ao modelo experimental de PA contaminada ou não por *E. faecalis*;

Avaliar parâmetros de estresse oxidativo e defesa enzimática no hipocampo, córtex frontal e LCR de ratos Wistar adultos submetidos ao modelo experimental de PA contaminada ou não por *E. faecalis*;

Avaliar as células gliais pela expressão da molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (IBA-1, para ativação microglial) e proteína ácida fibrilar glial (GFAP, para ativação de astrócitos) no hipocampo e córtex frontal de ratos Wistar adultos submetidos ao modelo experimental de PA contaminada ou não por *E. faecalis*;

Avaliar através de tomografia computadorizada mandibular em 10 e 21 dias, as alterações estruturais causadas pela indução experimental da PA contaminada ou não por *E. faecalis* em ratos Wistar adultos;

Avaliar memória e aprendizagem de ratos Wistar adultos através do teste comportamental de reconhecimento de novos objetos em 10 e 21 dias após a submissão ao modelo experimental de PA contaminada ou não por *E. faecalis*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Fisiopatologia Experimental e laboratório de Neurologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, SC, Brasil. O estudo foi realizado dentro das diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para pesquisas utilizando animais.

Este projeto tem aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESC com o 37/ 2022 (Anexo A). Sendo assim, todos os cuidados para evitar ou minimizar o sofrimento dos animais durante os experimentos foram adotados.

3.2. ANIMAIS

Para este estudo, foram utilizados ratos machos, da espécie *Rattus norvegicus*, Wistar, adultos, com 60 dias de vida, saudáveis, pesando entre 250 e 300 g e que não foram utilizados em outros estudos, provenientes do Centro de Experimentação Animal da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Estes foram acondicionados em caixas de no máximo cinco animais, com comida e água *ad libitum* (à vontade), mantidos em ambiente com temperatura aproximada de 23 °C +/- 1 °C e umidade relativa entre 55 e 65%, em um ciclo claro-escuro de 12 horas.

3.3. PREPARAÇÃO DO MICROORGANISMO INFECTANTE

A cepa de *E. faecalis*, ATCC 19433, proveniente do Fundação André Tosellho, São Paulo, Brasil, foi cultivada em 5 mL de caldo Todd Hewitt BBL™, a 37°C até crescimento logarítmico. No dia da indução a cultura foi centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm e suspendida em salina estéril até chegar a uma concentração de 1×10^9 unidades formadoras de colônias por mL (UFCol/ mL) (Chen, Lei, Luo *et al.* 2019).

3.4. MODELO DE LESÃO PERIAPICAL

Os animais pertencentes ao grupo PA foram anestesiados com cloridrato de cetamina (6,6 mg/ kg) e cloridrato de xilazina (0,3 mg/ kg) via intraperitoneal. Após, foram submetidos à PA utilizando caneta de alta rotação (Turbina Extra Torque 505C - Kavo), broca esférica carbide cirúrgica de carboneto de tungstênio número ½ com haste longa (Beavers Dental-55 Laurel Dr Morrisburg, Canadá). A PA foi induzida no primeiro molar inferior do lado direito de cada animal (Scarparo, Dondoni, Böttcher *et al.* 2011, Liu, Wang, Wu *et al.* 2014, Shah, Lee, Song *et al.* 2018).

Três pesquisadores foram necessários para fazer o procedimento. O primeiro manteve a cavidade oral do animal aberta com o uso de fio dental em amarela, segurando nos incisivos superiores e inferiores. O segundo foi responsável por aspirar a água da alta rotação com sugadores cirúrgicos descartáveis (Sugador Flex Suctor Cirúrgico - Angelus). O terceiro fez a perfuração endodôntica na superfície oclusal do primeiro molar inferior direito, até chegar ao teto da câmara pulpar e confirmado com a utilização de um instrumento endodôntico calibre 10 (lima K Flex Maillefer - Dentsply). Os grupos PA/ *E. Faecalis* e PA/ salina receberam 10 µL da suspensão bacteriana de *E. faecalis* ou salina (de acordo com o grupo experimental), transferidas para pequenas esferas de algodão estéreis e colocadas na cavidade medular exposta. A cavidade de acesso foi selada com cimento de ionômero de vidro. Os animais do grupo controle/ *E. faecalis* e controle/ salina receberam 10 µL da suspensão bacteriana ou salina, respectivamente, em *swab* aplicados diretamente na cavidade oral do animal (Chen, Lei, Luo *et al.* 2019).

Após o procedimento, a reposição volêmica com solução salina isotônica 0.9% (50 ml/ kg) foi administrada por via subcutânea e foram delicadamente colocados em suas respectivas gaiolas. Todos os animais foram monitorados quanto à dor e desconforto, e assim que eles apresentaram algum sinal de dor, foi administrado dipirona sódica na dose de 7 mg/ kg via intramuscular.

3.5. DESENHO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: controle/ salina, controle/ *E. faecalis*, PA/ salina e PA/ *E. faecalis*. Para que fossem possíveis todas as análises experimentais, foram necessários 100 ratos Wistar machos, totalizando 25 animais por grupo. No décimo dia após a indução da PA, os animais foram submetidos ao teste comportamental de reconhecimento de objetos novos e após, foram devidamente anestesiados e submetidos à tomografia computadorizada mandibular para avaliação da PA. Decorridos 21 dias após a indução da lesão, os animais foram novamente submetidos ao mesmo teste comportamental, e após foram anestesiados para a tomografia computadorizada mandibular. Em seguida, foram coletadas as amostras de LCR, hipocampo e córtex frontal. Os níveis de citocinas, parâmetros de estresse oxidativo e defesa enzimática foram analisados no LCR, hipocampo e córtex frontal. As células gliais foram analisadas em hipocampo e córtex frontal por imunohistoquímica (figura 3).

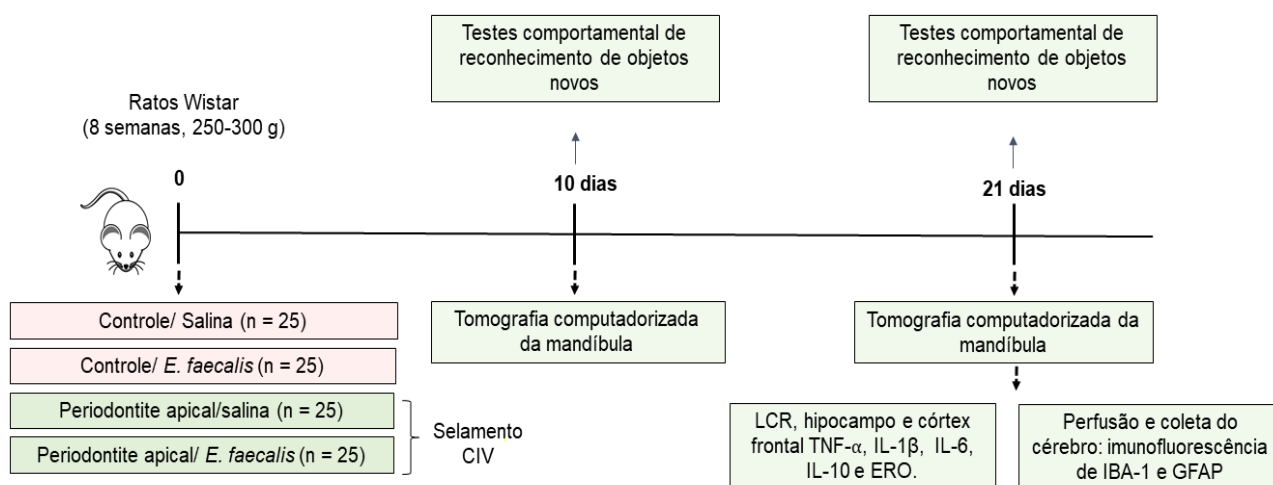


Figura 3: Representação do protocolo experimental. Figura elaborada pelo autor.

3.6. TESTE COMPORTAMENTAL

O teste comportamental foi realizado 10 dias após a indução e foi repetido com os mesmos animais 21 dias após a indução da PA.

3.6.1. Reconhecimento de objetos novos

Este teste avaliou a memória de longa duração. No primeiro dia comportamental foi realizado o treino dos animais, onde este foi alocado cuidadosamente no quadrado do canto posterior esquerdo do aparato de campo aberto, no qual observou-se sua exploração no ambiente por 5 minutos. O primeiro dia serviu como meio para habituar o animal. No segundo dia o animal foi recolocado no aparato, com dois objetos iguais. O objeto A e objeto B (forma, tamanho e cor iguais), contou-se o tempo que o animal explorou cada objeto (A e B). No dia seguinte (24 horas após) foi avaliada a memória de longa duração, onde realizou-se o mesmo procedimento trocando o objeto B pelo objeto C (diferente do objeto A) (figura 4), contando assim o tempo de exploração de cada objeto (de Lima, Laranja, Bromberg *et al.* 2005).

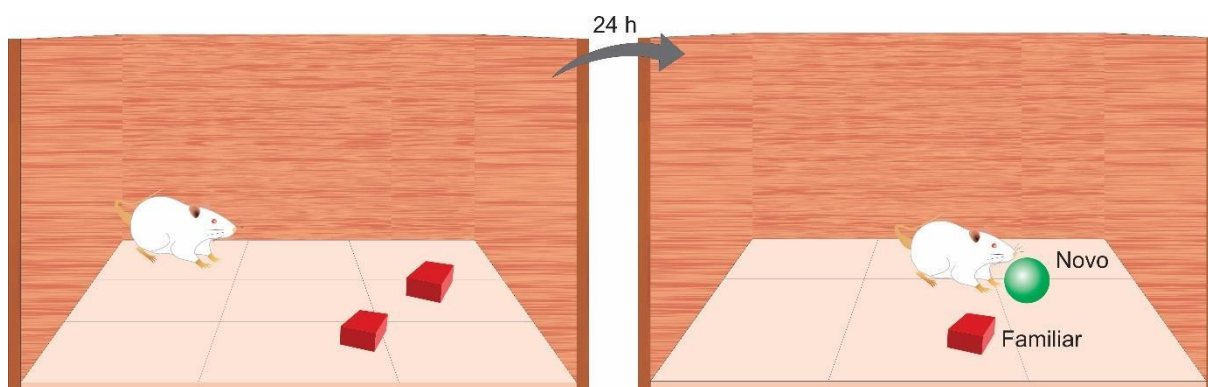


Figura 4: Aparato para avaliação do teste comportamental de reconhecimento de objetos. Figura elaborada pelo autor.

3.7. TOMOGRAFIA DA PA

No 10º e no 21º dia após a indução da PA, foi realizada uma tomografia computadorizada da mandíbula dos animais na clínica de Odontologia da UNESC. Para isso os animais, foram anestesiados com cloridrato de cetamina (6,6 mg/ kg) e cloridrato de xilazina (0,3 mg/ kg) via intraperitoneal e levados até a clínica de odontologia em caixa limpas e cobertas com “campo estéril”. As aquisições de imagem foram precedidas por escanograma para garantir que a região avaliada esteja dentro do volume a ser adquirido. Foi utilizado o campo de visão (do inglês field of view, FOV) de 6 X 8 cm e voxel de 0,1 cm. O aparelho utilizado foi um tomógrafo de feixe cônico (Instrumentarium OP 300 Finlândia), operado a 4 mA a 90

kVp e tempo de 6,1 segundos de exposição. O sistema utilizado para capturar as imagens foi o Cliniview e o programa para leitura dos arquivos DICOM (Medical Image Manipulation) foi o onDemand, atualizados em 2022, sendo que as imagens foram salvas no formato PNG (Kalatzis-Sousa, Spin-Neto, Wenzel *et al.* 2017, Chen, Lei, Luo *et al.* 2019). Foi utilizado filtro de melhoramento de imagem que permitiu o realce de linhas verticais e horizontais. Todas as imagens foram avaliadas por um radiologista odontológico sob luz ambiente reduzida e não houve tempo estimado para cada avaliação.

3.8. IMUNOHISTOQUIMICA

Para a imunocoloração, foram utilizadas amostras de tecido cerebral, hipocampo e córtex frontal, fixadas em formalina e embebidas em parafina. A desparafinização e reidratação foram realizadas usando uma série de xilenos, álcoois graduados e água. A recuperação de antígeno à base de calor foi realizada usando uma solução de citrato de sódio 1% para recuperação de antígeno com pH 9 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) por 30 minutos a 95 °C, seguidos por 30 minutos em gelo. As etapas de lavagem subsequentes, foram realizadas usando uma solução salina tamponada com fosfato 1x (PBS) (Bio-rad, EUA). A solução de peróxido de hidrogênio a 3% (VWR International, Radnor, PA) foi usada para bloquear a peroxidase endógena por 10 minutos. As seções de tecido foram bloqueadas à temperatura ambiente com soro de cavalo a 2,5% (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Após a etapa de bloqueio, o anticorpo primário IBA-1 (Abcam, ab178846, 1:1000), e GFAP (Abcam, ab7260, 1:1000) foi adicionado e mantido a 4 °C durante a noite. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com PBS e o anticorpo secundário biotilado de cabra anti-coelho (Millipore, MA, EUA) foi aplicado por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, o complexo Avidin-Biotin (ABC) foi adicionado por 1 hora. Após etapas de lavagem adicionais, o antígeno alvo foi visualizado usando cromogênio DAB em tampão de substrato (Vector, Burlingame, CA). Para a contra-coloração, foi aplicada hematoxilina e as lâminas foram levadas ao xileno e montadas com Permount™ (Fischer Chemicals). A coloração foi visualizada usando Nikon ECLIPSE Ci-S (Nikon Instruments, Tóquio, Japão) e as imagens foram capturadas (ampliação × 400) (Giridharan, Generoso, Collodel *et al.* 2021).

3.9. NÍVEIS DE CITOCINAS

As concentrações de citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-6 foram determinadas no LCR, hipocampo e córtex frontal, por kits ELISA, de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram homogeneizadas em tampão PBS contendo triton 0,1% e inibidor de protease (50 mM - Roche AG, Basileia, Suíça) e, em seguida, centrifugadas (13000 rpm a 4 °C durante 20 min). O sobrenadante foi recolhido e realizado a quantificação de proteína pelo kit de ensaio de proteína BCA (Thermo Scientific, EUA). O ensaio de ELISA foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e a leitura realizada na leitora de microplacas (SPECTRAMAX, Molecular Devices, USA). Os níveis de proteína foram apresentados em pg/ mg de proteína total (Lowry, Rosebrough, Farr *et al.* 1951).

3.10. AVALIAÇÃO DO DANO OXIDATIVO

O dano oxidativo foi avaliado nas amostras do LCR, hipocampo e córtex frontal.

3.10.1. Medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para a verificação dos indícios de peroxidação lipídica, foram medidos os níveis de TBARS durante uma reação ácida aquecida como previamente descrito (Draper ,Hadley 1990). Brevemente, as amostras obtidas foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético 10% e 1ml de ácido tiobarbitúrico, fervidas por 15 minutos e após a quantidade de TBARS foi determinada pela absorbância em 535 nm.

3.10.2. Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil

Para a avaliação do dano oxidativo em proteínas foram utilizadas a determinação de grupos carbonil conforme previamente descrito (Levine, Garland, Oliver *et al.* 1990). Brevemente, as amostras obtidas foram precipitadas e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilidrazina. Os grupamentos carbonil foram medidos pela absorbância em 370 nm.

3.10.3. Atividade oxidativa - DCFH

A produção de hidroperóxidos foi determinada pela formação intracelular de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) a partir da oxidação do diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) por ERO de acordo com o método descrito previamente (LeBel, Bondy 1992).

3.10.4. Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio em 240 nm conforme previamente descrito (Aebi 1984, Bannister, Calabrese 1987). A atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente conforme previamente descrito (Lissi, Salim-Hanna, Pascual *et al.* 1995).

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e para homogeneidade usando o teste de Levene. Para as análises bioquímicas os dados foram apresentados como média \pm EPM e analisados por ANOVA de uma via, seguido de teste *post hoc* Tukey. Dados da tarefa de reconhecimento de objetos foram realizados pelo teste U-Mann-Whitney. As comparações dentro dos grupos serão realizadas pelo teste de Wilcoxon. Para todas as análises, foram adotadas um intervalo de confiança de 95% com nível de significância de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 20.0.

3.12. DESCARTE DOS MODELOS ANIMAIS

Os animais foram decapitados através de guilhotina, sendo este considerado um método restrito de eutanásia pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, publicadas em 2013. Após os experimentos, o armazenamento da carcaça foi realizado com a utilização de saco branco leitoso que

foi depositado no freezer da UNESC. Logo, foram coletados e transportados por empresa terceirizada. Os resíduos então foram tratados fisicamente e encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos estão de acordo com a RDC 306/ 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

4. RESULTADOS

4.1. TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DE FEIXE CÔNICO (TCFC) EM 10 E 21 DIAS APÓS INDUÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL

Ao analisar as dimensões e o volume em 10 dias nos grupos controle/ salina, controle/ *E. faecalis*, PA/ salina e PA/ *E. faecallis*, pode-se observar que não houve formação de lesão neste período à nível da TCFC (figuras 5, 6, 7 e 8). No entanto no 21º, observou-se que os animais dos grupo PA/ salina (figura 11) apresentaram um aumento da radiolucidez apical quando comparados aos grupos controle/ salina e controle/ *E. faecallis* ($p < 0,05$) (figura 9 e 10), indicando a presença de formação da PA nestes grupos. Os animais do grupo PA/ *E. faecallis*, (figura 12) tiveram um volume ainda maior quando comparados ao grupo PA/ salina ($p < 0,05$), caracterizando que a bactéria *E. faecallis*, ampliou o volume da lesão em 21 dias após a indução do modelo experimental (figura 13 e 14).

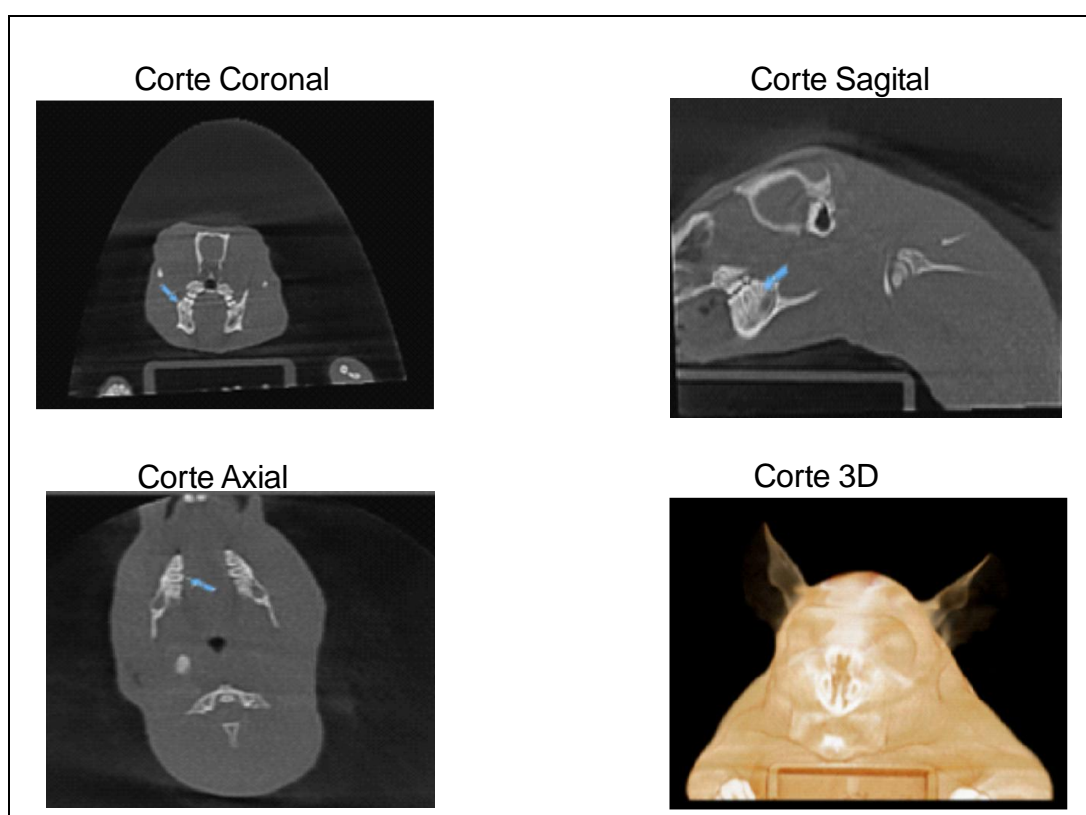


Figura 5: Imagem de TCFC do modelo animal - grupo controle/ salina com 10 dias após indução da PA. As imagens acima mostram os resultados obtidos das dimensões e volumes dos cortes coronal, sagital axial e 3D, das periodontites apicais formadas em milímetros (mm) em 10 dias, de 6 animais por grupo. Figura elaborada pelo autor.

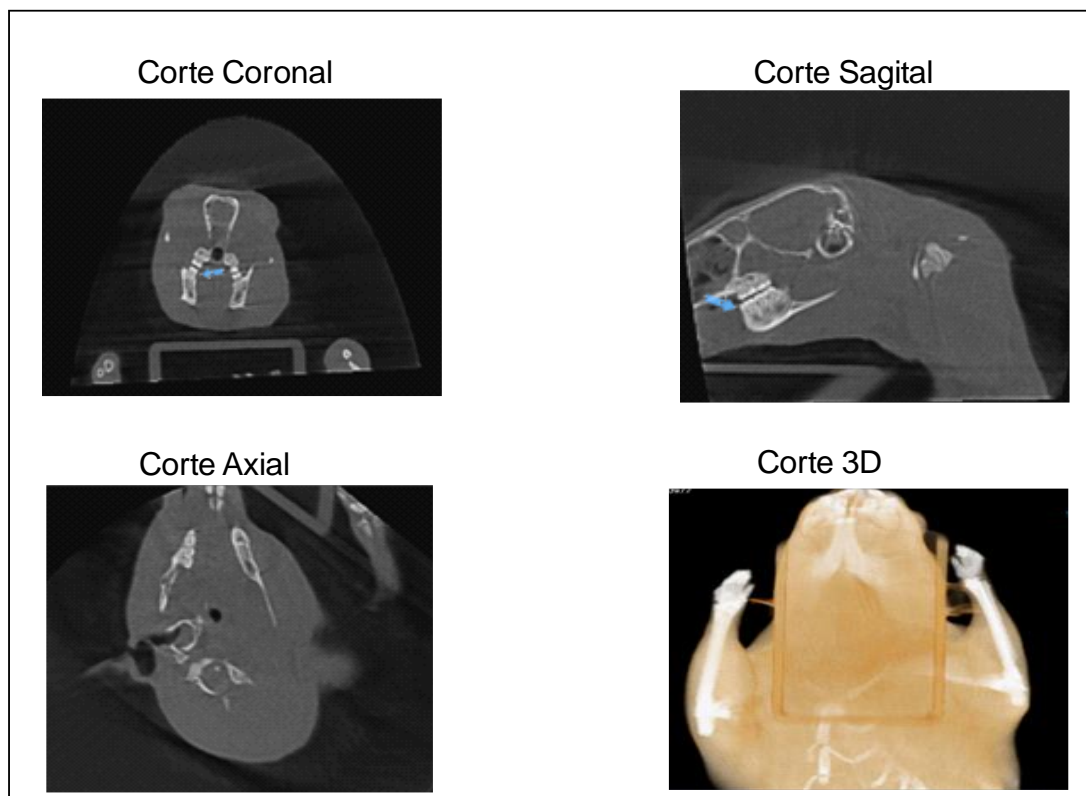


Figura 6: Imagem de TCFC do modelo animal - grupo controle/ *E. Faecalis* com 10 dias após indução da PA. As imagens acima mostram os resultados obtidos das dimensões e volumes dos cortes coronal, sagital axial e 3D, das periodontites apicais formadas em milímetros (mm) em 10 dias, de 6 animais por grupo. Figura elaborada pelo autor.

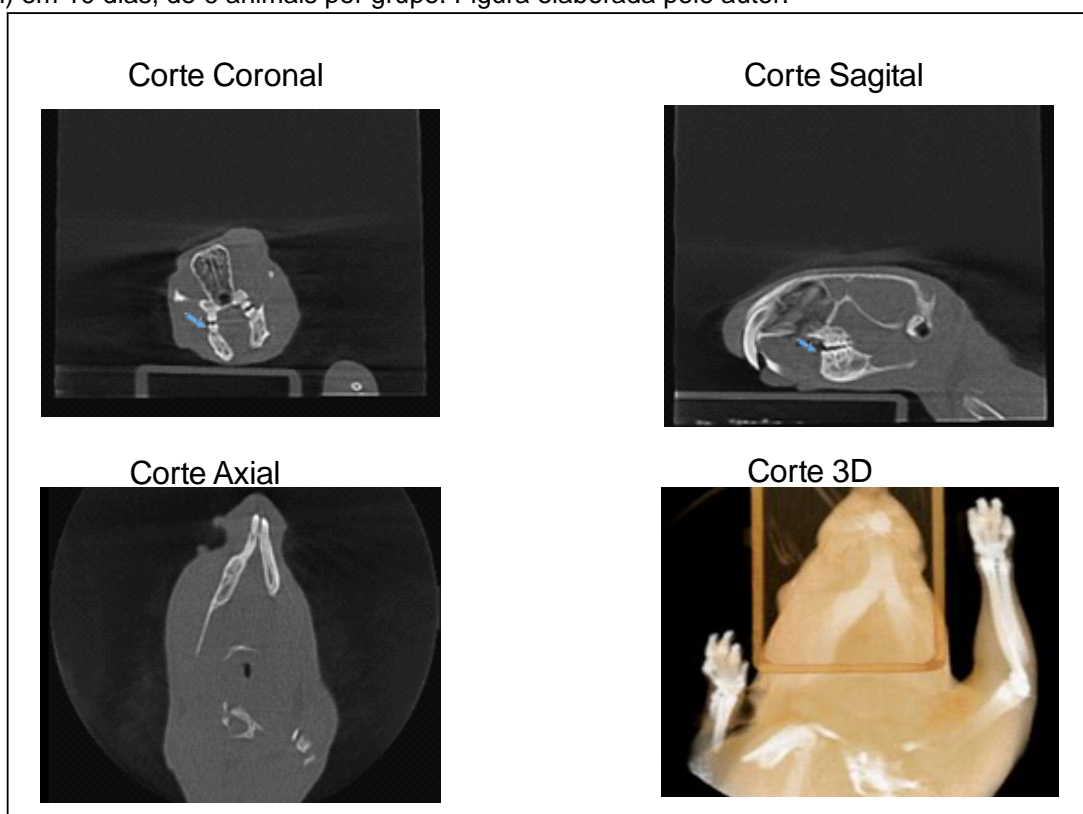


Figura 7: Imagem de TCFC do modelo animal - PA/ salina com 10 dias após indução da PA. As imagens acima mostram os resultados obtidos das dimensões e volumes dos cortes

coronal, sagital axial e 3D, das periodontites apicais formadas em milímetros (mm) em 10 dias, de 6 animais por grupo. Figura elaborada pelo autor.

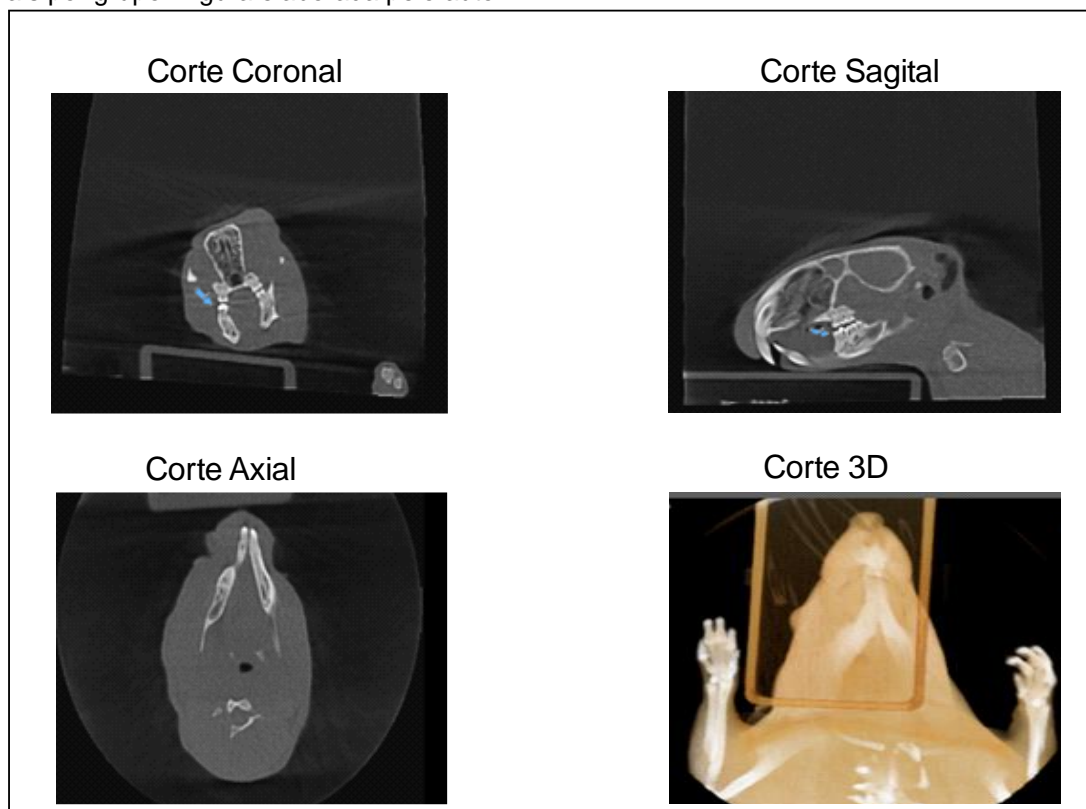


Figura 8: Imagem de TCFC do modelo animal - grupo PA/ E. Faecalis com 10 dias após indução da PA. As imagens acima mostram os resultados obtidos das dimensões e volumes dos cortes coronal, sagital axial e 3D, das periodontites apicais formadas em milímetros (mm) em 10 dias, de 6 animais por grupo. Figura elaborada pelo autor.

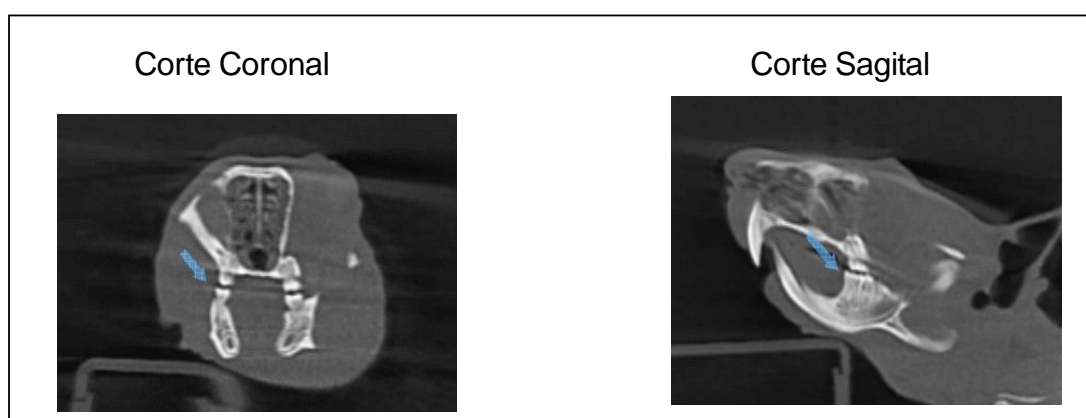


Figura 9: Imagem de TCFC do modelo animal - grupo controle/ salina em 21 dias após indução da PA. As imagens acima mostram os resultados obtidos das dimensões e volumes dos cortes coronal, sagital axial e 3D, das periodontites apicais formadas em milímetros (mm) em 21 dias, de 6 animais por grupo. Figura elaborada pelo autor.

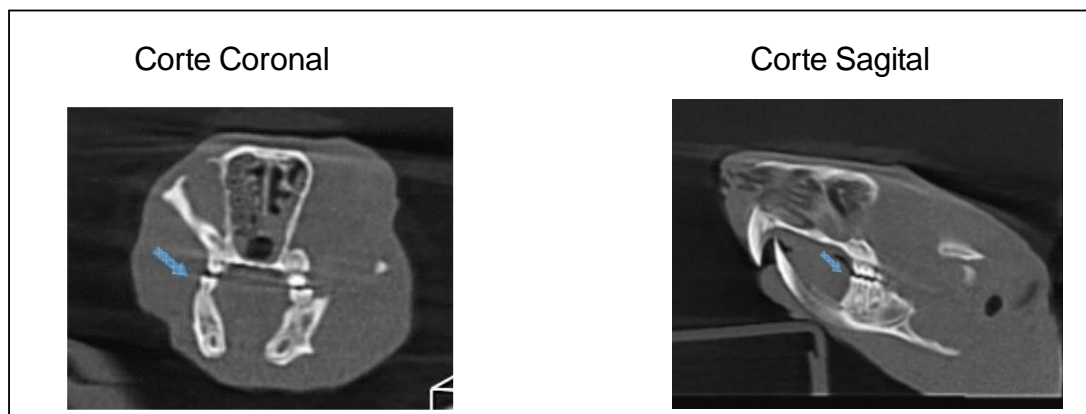


Figura 10: Imagem de TCFC do modelo animal - grupo controle/ *E. faecalis* em 21 dias após indução da PA. As imagens acima mostram os resultados obtidos das dimensões e volumes dos cortes coronal, sagital axial e 3D, das periodontites apicais formadas em milímetros (mm) em 21 dias, de 6 animais por grupo. Figura elaborada pelo autor.

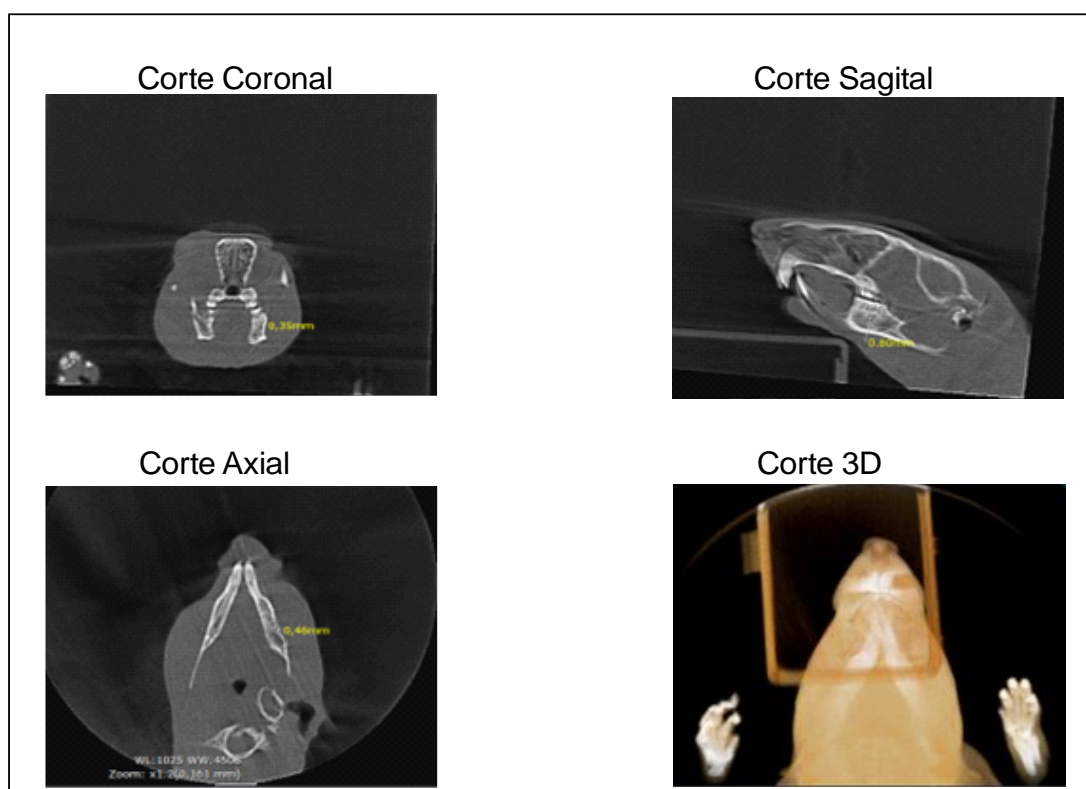


Figura 11: Imagem de TCFC do modelo animal - grupo PA/ salina em 21 dias após indução da PA. As imagens acima mostram os resultados obtidos das dimensões e volumes dos cortes coronal, sagital axial e 3D, das periodontites apicais formadas em milímetros (mm) em 21 dias, de 6 animais por grupo. Figura elaborada pelo autor.

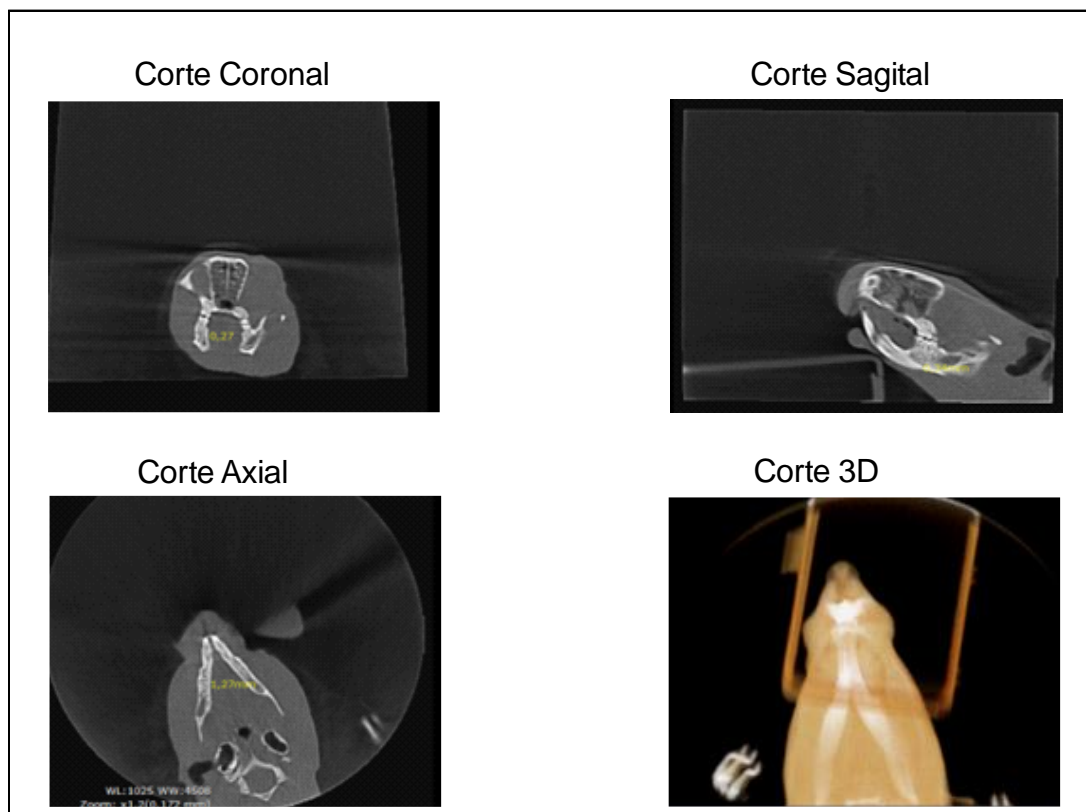


Figura 12: Imagem de TCFC do modelo animal - grupo PA/ *E. Faecalis* em 21 dias após indução da PA. As imagens acima mostram os resultados obtidos das dimensões e volumes dos cortes coronal, sagital axial e 3D, das periodontites apicais formadas em milímetros (mm) em 21 dias, de 6 animais por grupo. Figura elaborada pelo autor.

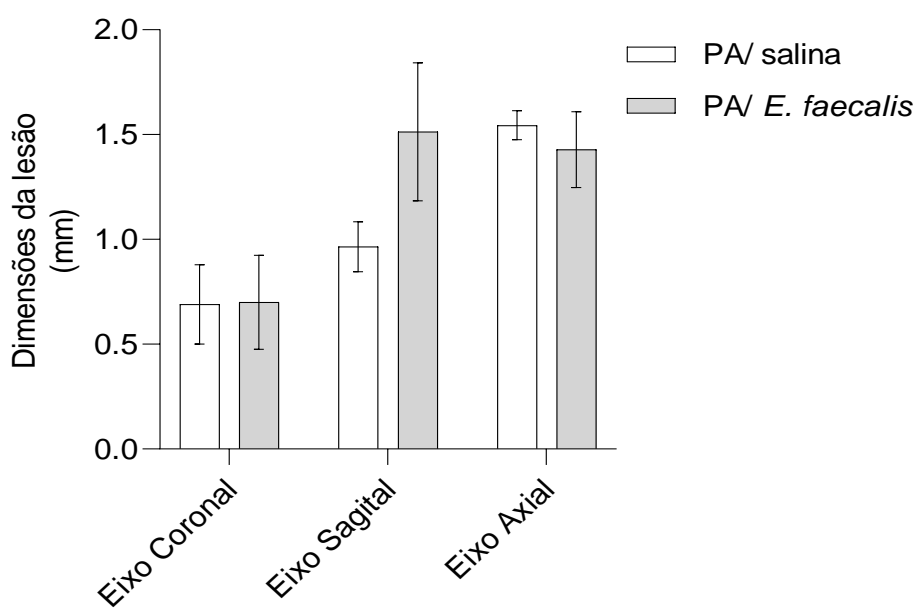


Figura 13: Dimensões das lesões avaliadas por TCFC. O gráfico acima mostra os resultados obtidos das dimensões das periodontites apicais formadas em milímetros (mm) em 21 dias. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando teste ANOVA de 1 via. O símbolo * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa. Figura elaborada pelo autor.

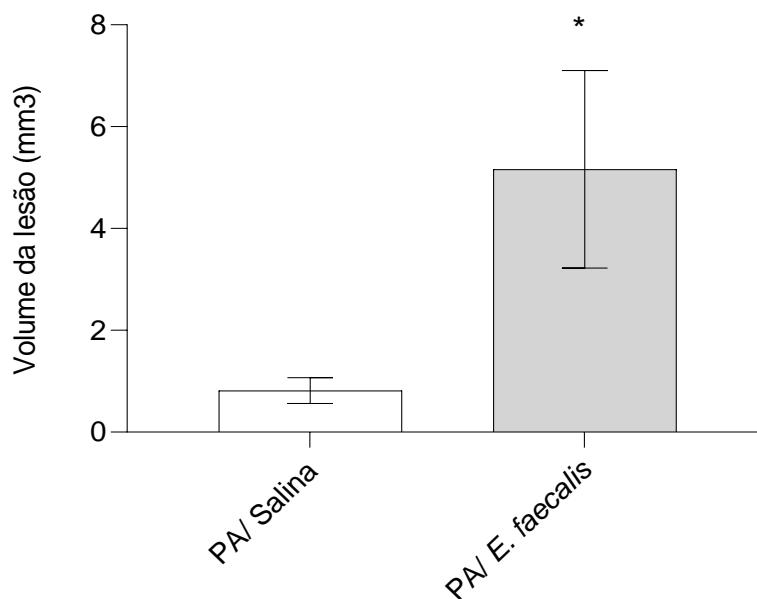
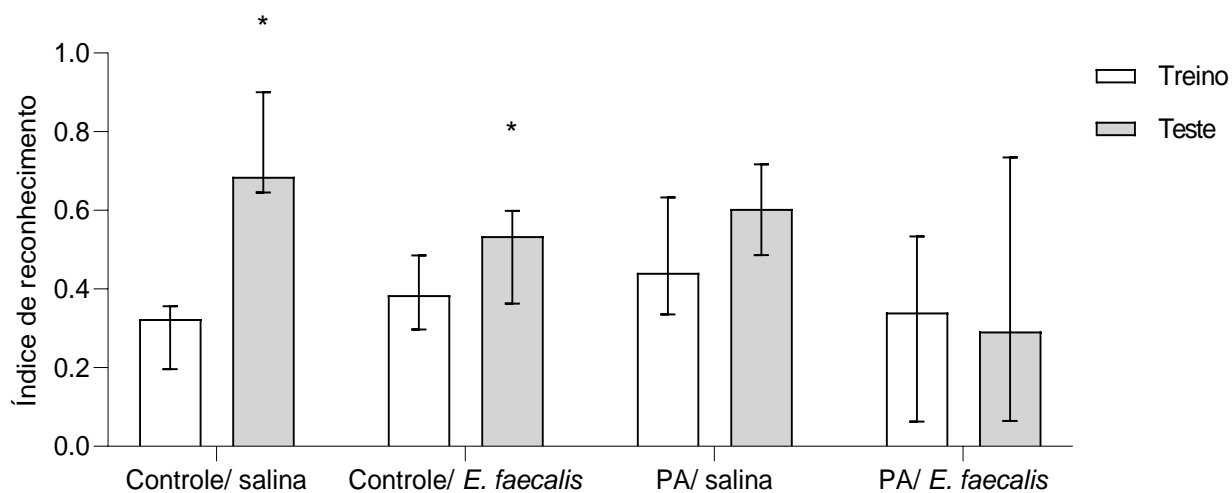


Figura 14: Volume das lesões de periodontites apicais. O gráfico acima mostra os resultados obtidos do volume das periodontites apicais formadas em milímetros cúbicos (mm^3) em 21 dias. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando teste ANOVA de 1 via. O símbolo * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa. Figura elaborada pelo autor.

4.2. TESTE COMPORTAMENTAL

No teste de reconhecimento de novos objetivos, figura 15, é possível observar que em 10 dias (figura 15A) e 21 dias (figura 15B) após a indução do modelo experimental, os animais do grupo controle/ salina e controle/ *E. faecalis* utilizaram mais tempo para o reconhecimento do novo objeto na sessão teste comparada a sessão treino, o que indica que esses animais apresentaram memória de longo prazo. Entretanto nos grupos PA/ salina e PA/ *E. faecalis* não houve diferença no índice de reconhecimento entres as sessões treino e teste, demonstrando mesmo tempo de exploração ao novo objeto e indicando uma redução na memória dos animais.

15A)



15B)

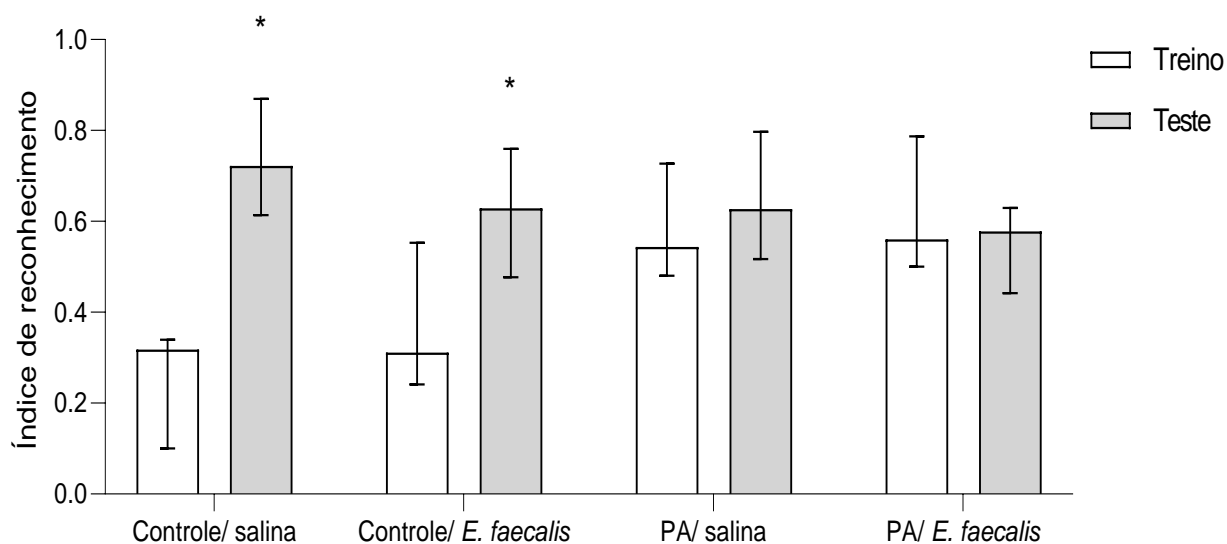


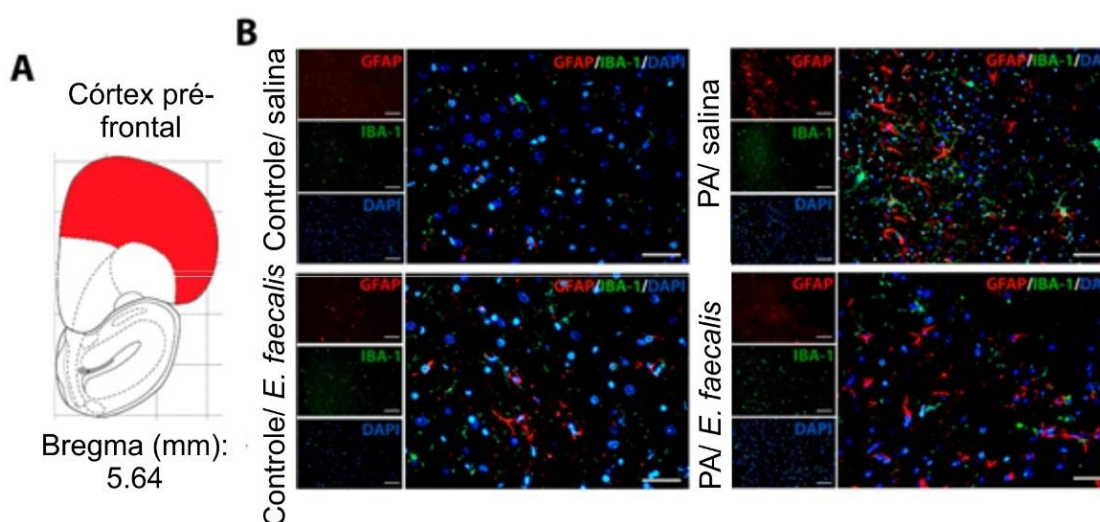
Figura 15: Teste de reconhecimento de novos objetos em ratos Wistar adultos 10 e 21 dias após indução de PA. Os dados foram apresentados como mediana e intervalo interquartil de 10 animais por grupo e as comparações entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste U *Mann-Whitney*. As comparações dentro de cada grupo foram realizadas pelo teste de Wilcoxon. O símbolo * $p < 0.05$ indicam significância estatística entre as sessões treino e teste. Figura elaborada pelo autor.

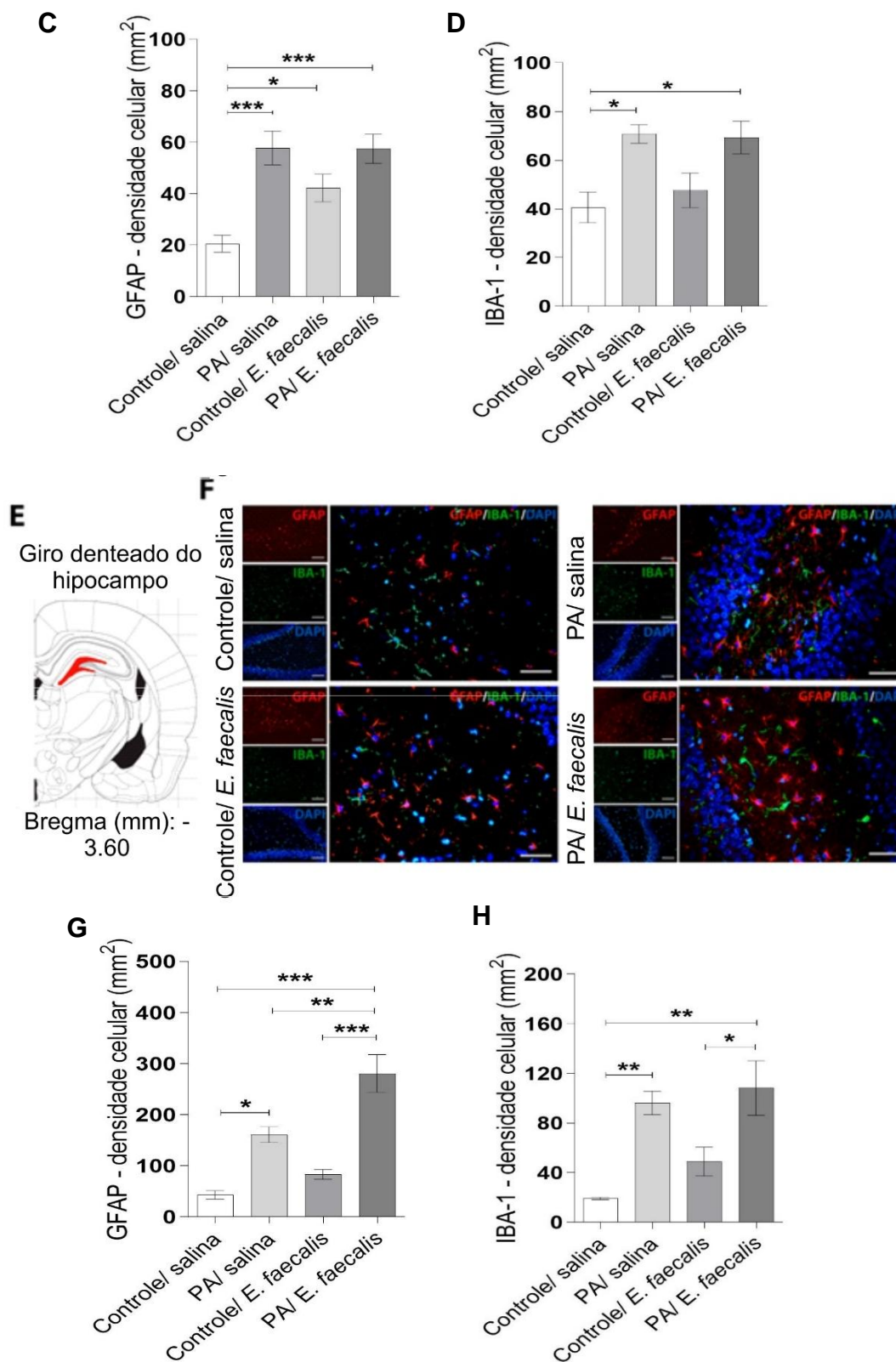
4.3. ATIVAÇÃO ASTROCITÁRIA E MICROGLIAL

A figura 16 apresenta a expressão de GFAP e IBA-1 no córtex pré-frontal (A, B, C e D), giro denteado hipocampo (E, F, G e H) e região CA1 do hipocampo (I, J, K e L). No córtex pré-frontal, houve aumento da expressão de GFAP nos grupos controle/ *E. faecalis*, PA/ salina e PA/ *E. faecalis* quando comparados ao grupo controle/ salina ($p > 0,05$). A expressão de IBA-1 foi aumentada no grupo PA/ salina e PA/ *E. faecalis* comparada ao grupo controle/ salina.

No giro denteado hipocampal (E, F, G e H) houve aumento da expressão de GFAP e IBA-1 no grupo PA/ salina e no grupo PA/ *E. faecalis* quando comparado ao grupo controle/ salina. No entanto, o grupo PA/ *E. faecalis* apresentou aumento significativo da expressão de GFAP comparado a todos os demais grupos. A expressão de IBA-1 também foi aumentada no grupo PA/ *E. faecalis* comparado ao grupo controle/ *E. faecalis* e controle/ salina.

Na região CA1 do hipocampo pode-se observar aumento de GFAP no grupo PA/ salina e no grupo PA/ *E. faecalis* quando comparado ao grupo controle/ salina. No grupo PA/ *E. faecalis* apresentou aumento significativo da expressão de GFAP comparado a todos os demais grupos. Enquanto a expressão de IBA-1 foi aumentada somente no grupo PA/ *E. faecalis* quando comparado ao grupo controle/ salina.





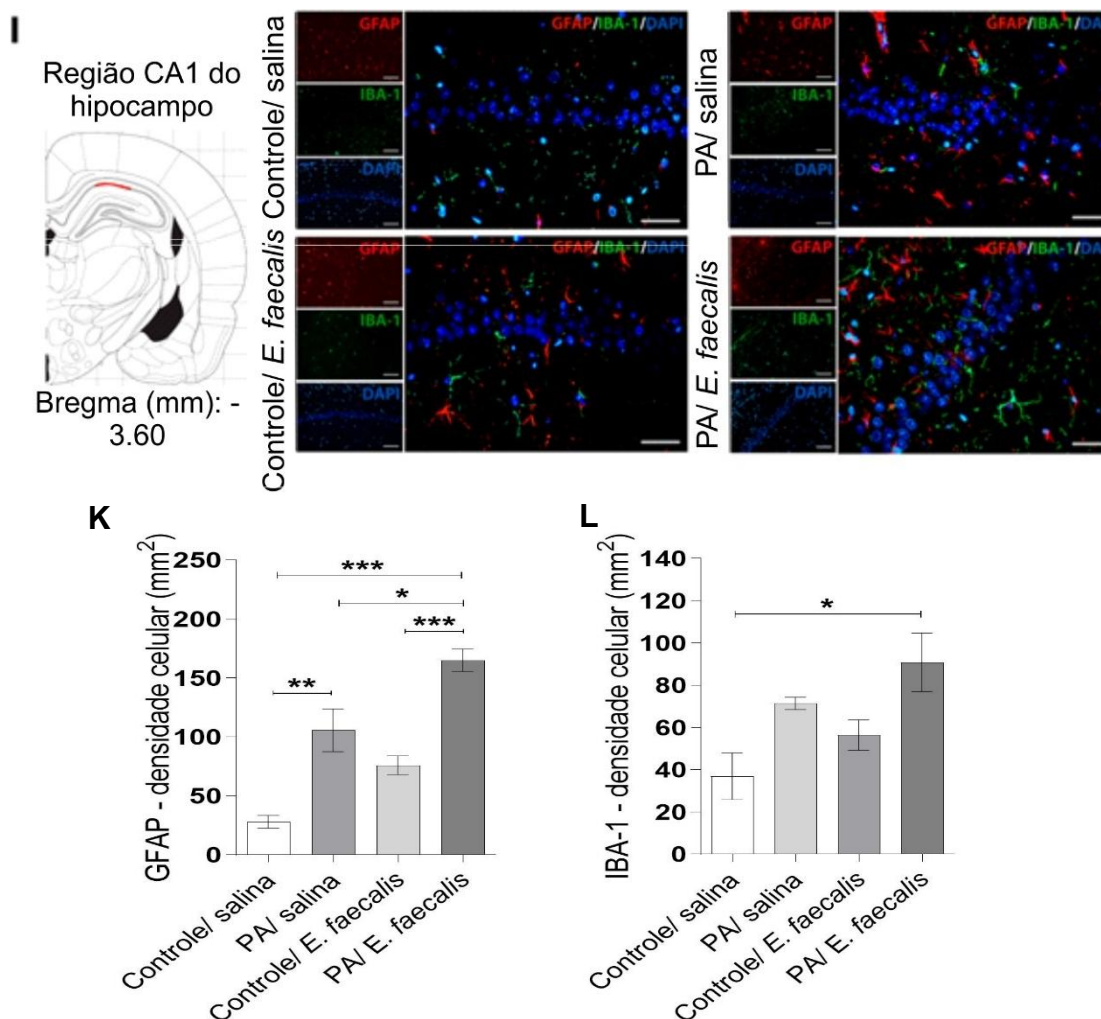


Figura 16. Marcadores de ativação astrocitário e microglial. Expressão de GFAP e IBA1 no córtex pré-frontal (A, B, C e D), giro dentado hipocampo (E, F, G e H) e região CA1 do hipocampo (I, J, K e L). Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando teste ANOVA de 1 via. Os símbolos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam diferença estatisticamente significativa. Figura elaborada pelo autor.

4.4. CITOCINAS

4.4.1. NÍVEIS DE TNF- α

Os níveis de TNF- α foram aumentados no LCR nos grupos controle/ *E. faecalis* e PA/ salina comparados ao grupo controle/ salina. No hipocampo é possível observar aumento significativo nos grupos controle/ *E. faecalis*, PA/ salina e PA/ *E. faecalis* comparados ao grupo controle/ salina. No córtex frontal houve aumento significativo nos grupos controle/ *E. faecalis*, PA/ salina e PA/ *E. faecalis* comparados ao grupo controle/ salina. Ainda, houve aumento no grupo PA/ *E. faecalis* comparado ao grupo PA/ salina (figura 17).

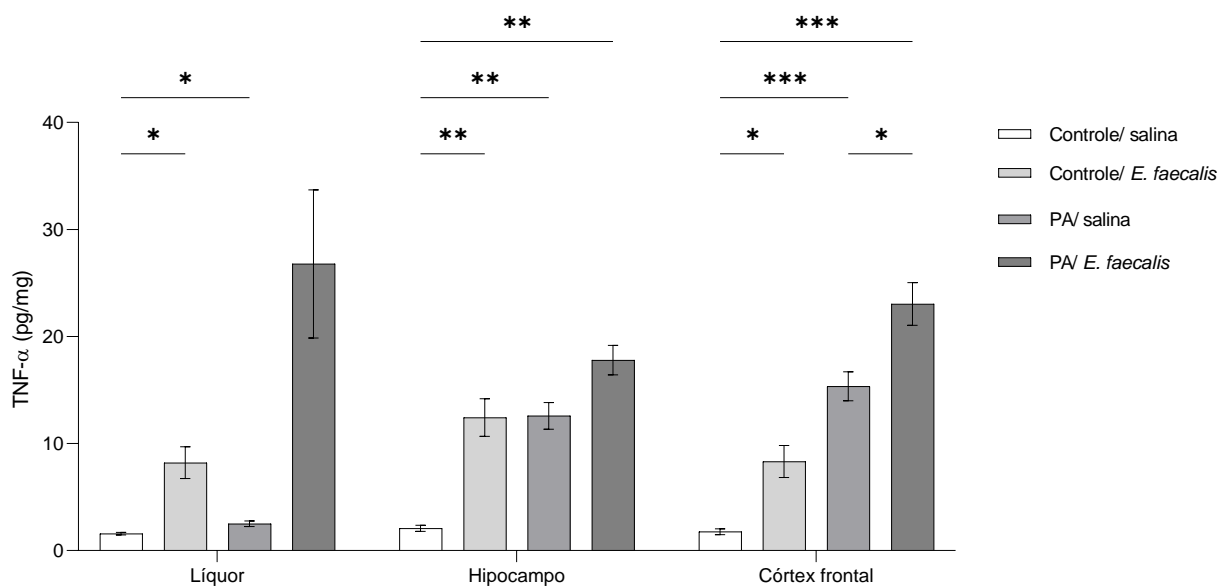


Figura 17. Níveis de TNF- α em regiões cerebrais. O gráfico acima mostra os resultados obtidos na quantificação dos níveis de TNF- α em líquor, hipocampo e córtex frontal, nos diferentes grupos 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando teste ANOVA de 2 vias. Os símbolos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado entre os grupos. Figura elaborada pelo autor.

4.4.2. NÍVEIS DE IL-1 β

Como mostra a figura 18, foi observado um aumento nos níveis de IL-1 β no LCR do grupo PA/ *E. faecalis* comparado ao grupo controle/ salina ($p = 0,0010$). No hipocampo houve aumento no grupo controle/ *E. faecalis* ($p = 0,0494$) e PA/ *E. faecalis* ($p = 0,0074$) comparados ao grupo controle/ salina. No córtex frontal, houve aumento no grupo controle/ *E. faecalis* ($p = 0,0189$), PA/ salina ($p = 0,0016$) e PA/ *E. faecalis* ($p = 0,0004$) comparados ao grupo controle/ salina. Além disso, houve aumento no grupo PA/ *E. faecalis* quando comparado ao grupo PA/ salina ($p = 0,0085$).

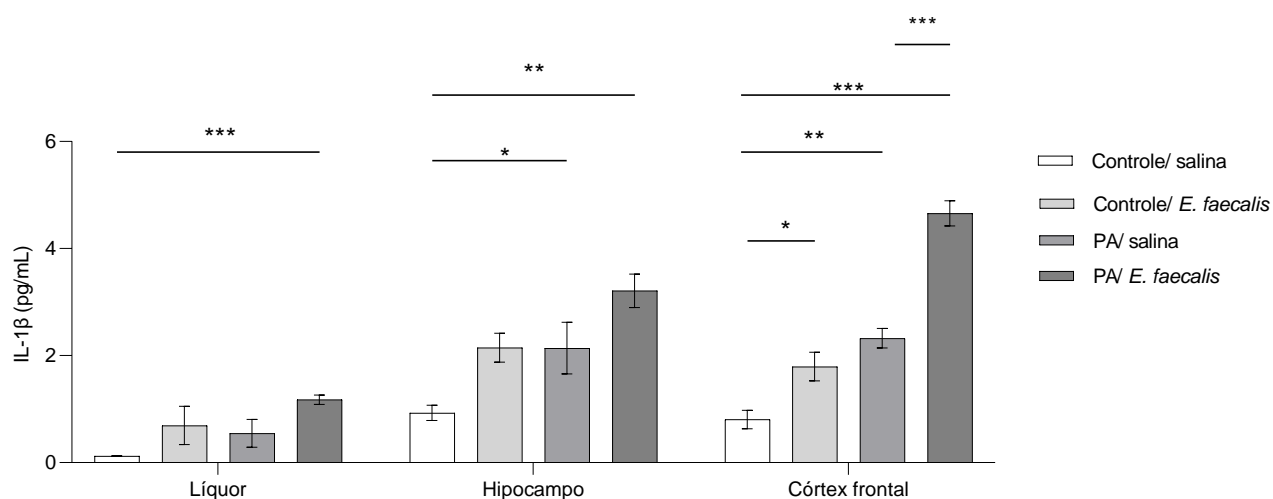


Figura 18. Níveis de IL-1 β em regiões cerebrais. O gráfico acima mostra os resultados obtidos na quantificação dos níveis de IL-1 β no líquido, hipocampo e córtex frontal nos diferentes grupos experimentais 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando teste ANOVA de 2 vias. Os símbolos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado entre os grupos. Figura elaborada pelo autor.

4.4.3. NÍVEIS DE IL-6

Quando avaliado os níveis de IL-6 (figura 19), foi observado aumento no LCR ($p = 0,0002$), do grupo PA/ *E. faecalis* comparado aos grupos controle/ salina. No hipocampo, houve aumento nos grupos controle/ *E. faecalis* ($p = 0,0308$), grupo PA/ salina ($p = 0,0151$) e PA/ *E. faecalis* ($p = 0,0026$) comparado ao grupo controle/ salina. No córtex frontal os níveis de IL-6 também foram aumentados nos grupos controle/ *E. faecalis* ($p = 0,0283$), grupo PA/ salina ($p < 0,0001$) e PA/ *E. faecalis* ($p = 0,0008$) comparado ao grupo controle/ salina.

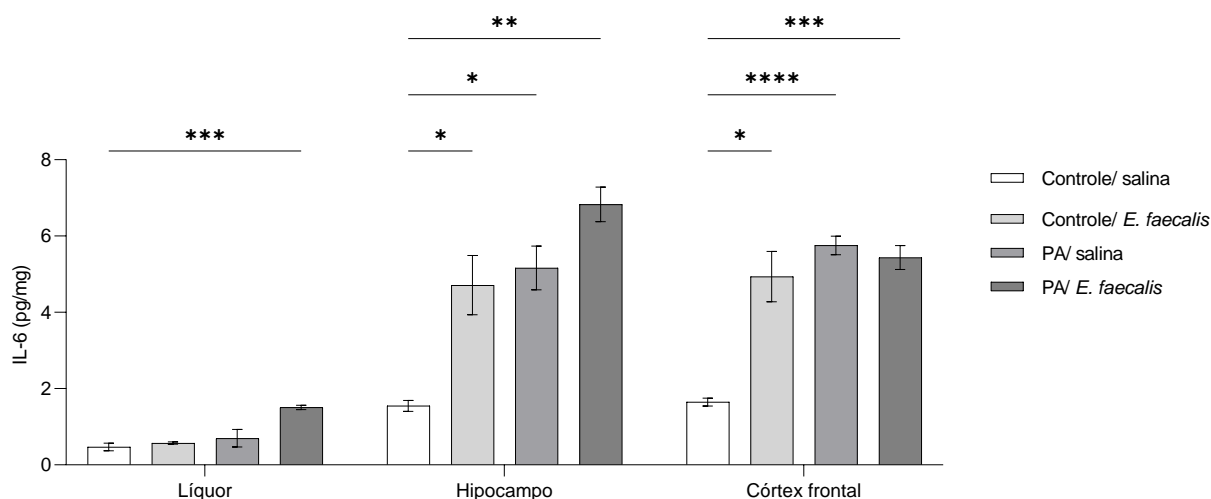


Figura 19. Níveis de IL-6 em regiões cerebrais. O gráfico acima mostra os resultados obtidos

na quantificação dos níveis de IL-6 no líquido, hipocampo e córtex frontal nos diferentes grupos experimentais 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando teste ANOVA de 2 vias. Os símbolos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado entre os grupos. Figura elaborada pelo autor.

4.4.4. NÍVEIS DE IL-10

Ao avaliar os níveis de IL-10, figura 20, não foram observadas alterações significativas em nenhuma das estruturas avaliadas.

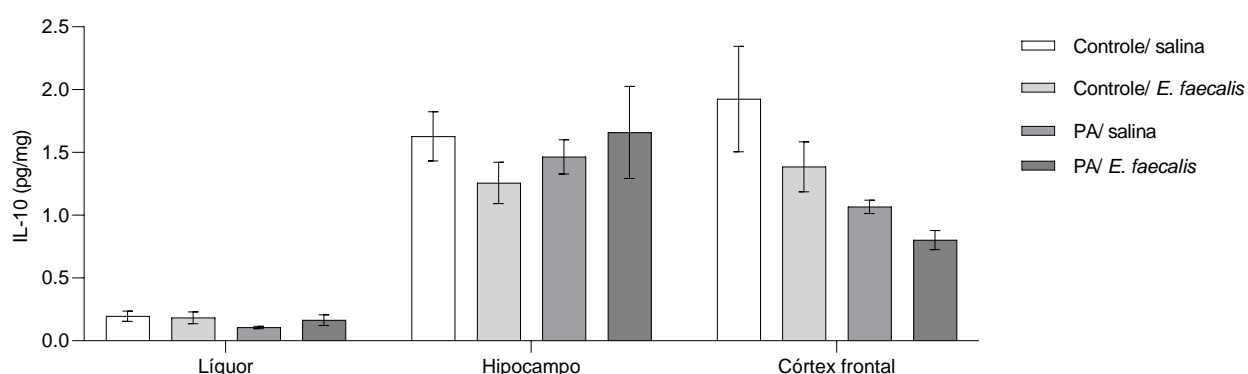


Figura 20. Níveis de IL-10 em regiões cerebrais. O gráfico acima mostra os resultados obtidos na quantificação dos níveis de IL-10 no líquido, hipocampo e córtex frontal nos diferentes grupos experimentais 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando teste ANOVA de 2 vias. Os símbolos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado entre os grupos. Figura elaborada pelo autor. Figura elaborada pelo autor.

4.5. DANO OXIDATIVO

4.5.1. NÍVEIS DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA - TBARS

A figura 21 mostra os níveis de peroxidação lipídica, avaliado pela técnica de TBARS, mensuradas no LCR, hipocampo e córtex frontal verificando-se aumento nos grupos PA/ salina e PA/ *E. faecalis* comparados ao grupo controle/ salina. Os níveis de TBARS mantiveram-se exacerbados nas mesmas estruturas nos grupos PA/ *E. faecalis* comparado ao grupo PA/ salina.

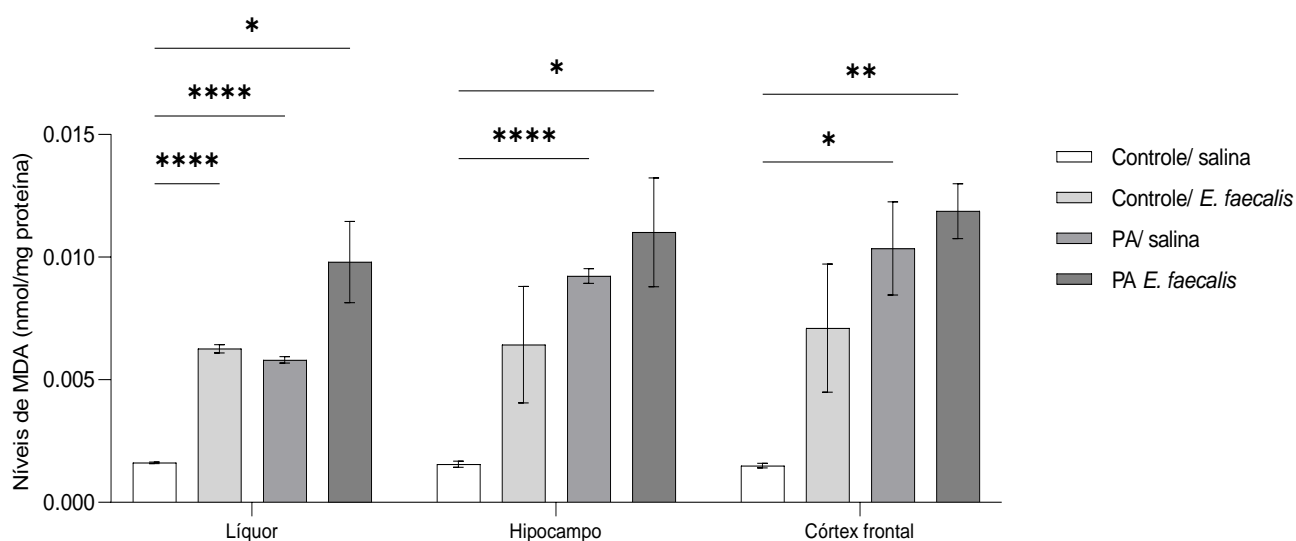


Figura 21. Níveis de peroxidação lipídica. O gráfico acima mostra os resultados obtidos na quantificação dos níveis de malondialdeído (MDA) no líquido, hipocampo e córtex frontal nos diferentes grupos experimentais 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando teste ANOVA de 2 vias. Os símbolos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado entre os grupos. Figura elaborada pelo autor.

4.5.2. CARBONILAÇÃO DE PROTEÍNAS

A figura 22 mostra os níveis de grupamento carbonil, avaliados no LCR, hipocampo e córtex frontal e verificou-se aumento nos grupos PA/ salina e PA/ *E. faecalis* comparados ao grupo controle/ salina. Os níveis de grupamento carbonil mantiveram-se aumentados no LCR grupo PA/ *E. faecalis* comparado ao grupo controle/ *E. faecalis*.

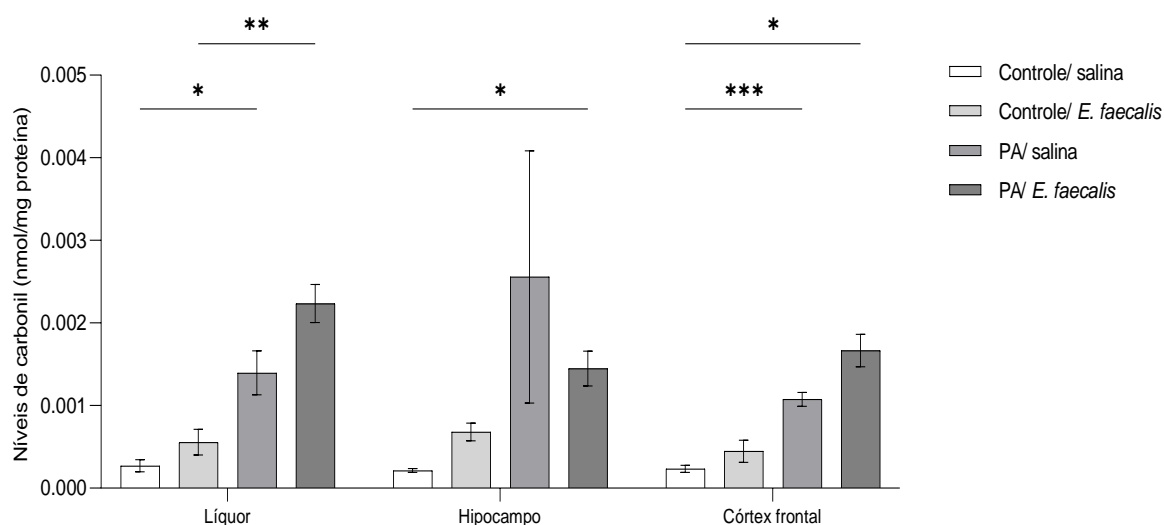


Figura 22. Níveis de carbonilação de proteínas. O gráfico acima mostra os resultados obtidos na quantificação dos níveis de grupamento carbonil no líquido, hipocampo e córtex frontal nos

diferentes grupos experimentais 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando teste ANOVA de 2 vias. Os símbolos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado entre os grupos. Figura elaborada pelo autor.

4.5.3. PRODUÇÃO DE EROs - DCFH

Os níveis de produção de EROs foram avaliados por DCFH (figura 23). No LCR, hipocampo, córtex frontal houve aumento de DCFH nos grupos PA/ salina e PA/ *E. faecalis* comparados ao grupo controle/ salina. Ainda, houve uma exacerbação dos níveis de DCFH no grupo PA/ *E. faecalis* comparado ao grupo PA/ salina.

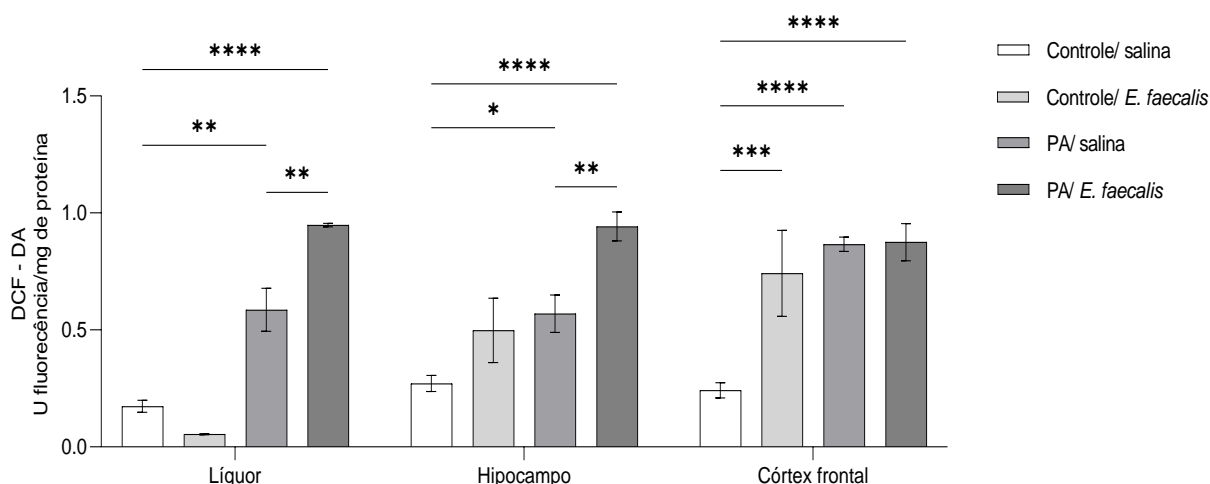


Figura 23. Níveis de EROs avaliados por DCFH. O gráfico acima mostra os resultados obtidos na quantificação dos níveis de DCF- DA no líquido, hipocampo e córtex frontal nos diferentes grupos experimentais 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando teste ANOVA de 2 vias. Os símbolos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado entre os grupos. Figura elaborada pelo autor.

4.5.4. ATIVIDADE DA SOD E CAT

As atividades da SOD e CAT foram mensuradas em LCR, hipocampo, córtex frontal, figura 24. Os níveis de SOD demonstraram aumento no grupo PA/ *E. faecalis* quando comparado com grupo controle/ salina em córtex frontal. Já os níveis de CAT demonstraram aumento no grupo PA/ *E. faecalis* quando comparado com grupo controle/ salina em córtex frontal e hipocampo.

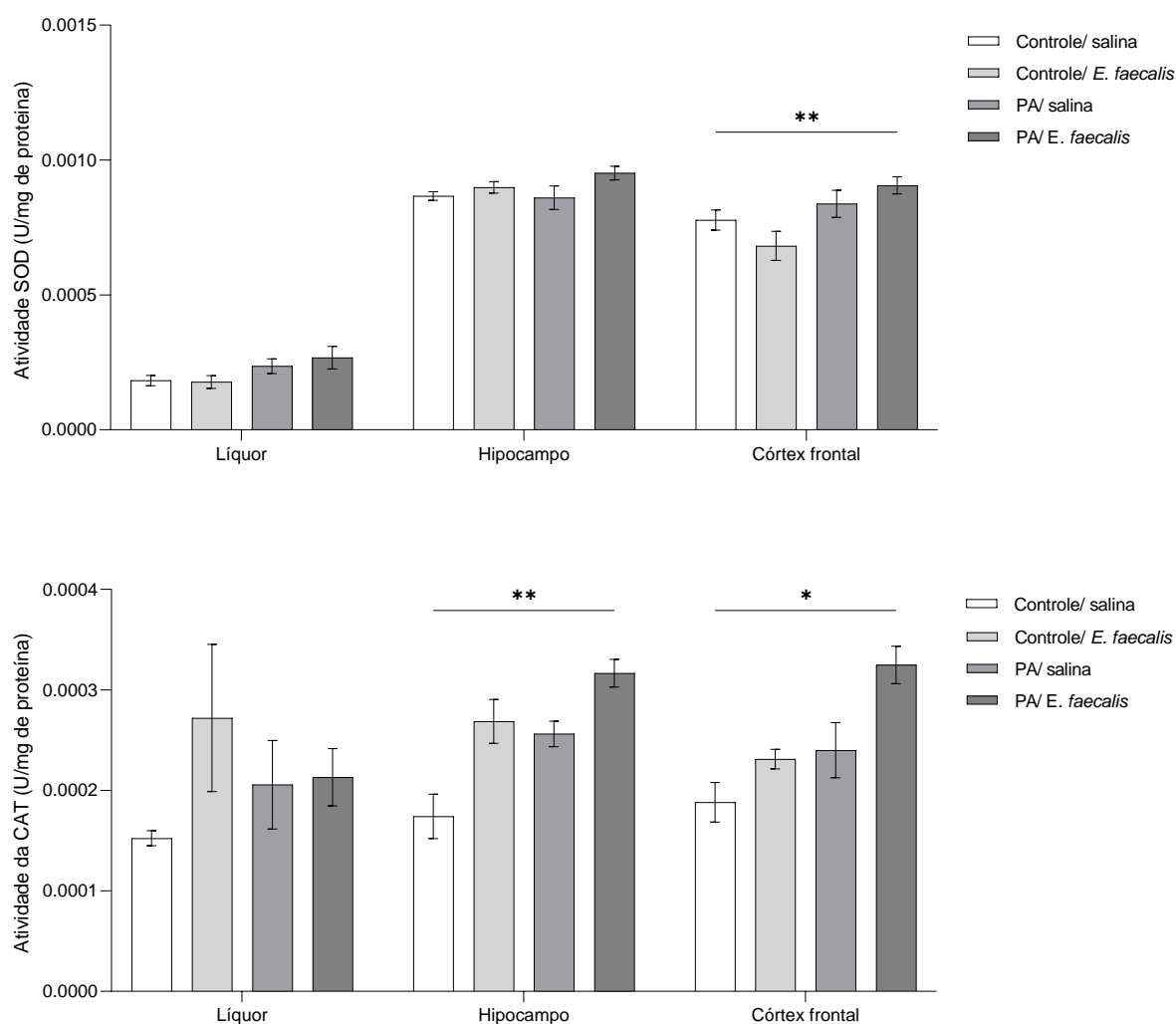


Figura 24. Atividade de SOD e CAT. O gráfico acima mostra os resultados obtidos na quantificação dos níveis de SOD e CAT no líquido, hipocampo e córtex frontal nos diferentes grupos experimentais 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média \pm EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando teste ANOVA de 2 vias. Os símbolos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ indicam diferença estatisticamente significativa quando comparado entre os grupos. Figura elaborada pelo autor.

5. DISCUSSÃO

Durante a vida do indivíduo, os dentes sofrem injúrias diárias, sendo a principal delas a cárie dental. Entretanto outras doenças como as periodontais, a PA e os traumas, podem causar a perda do elemento dental quando não tratadas. Estas patologias acontecem na presença de microrganismos comumente encontrados na cavidade oral, sendo que a cárie dental e as doenças periodontais ocupam a primeira e a décima primeira posição, respectivamente, entre as infecções humanas mais prevalentes em todo o mundo (Velázquez-Moreno, González-Amaro, Aragón-Piña *et al.* 2023). Microrganismos patogênicos podem invadir o sistema de canais radiculares por diferentes vias, sendo que as principais são as lesões de cáries profundas, as lesões periodontais e os traumas (Dioguardi, Di Gioia, Illuzzi *et al.* 2019).

As infecções endodônticas possuem microbiota abundante de composição inespecífica (Gaeta, Marruganti, Ali *et al.* 2023). Quando uma infecção bacteriana persiste por longo período na cavidade oral, as bactérias podem ultrapassar o forame apical, invadir os tecidos periapicais e causar a PA, uma situação crônica e caracterizada por inflamação persistente e destruição óssea progressiva na região perirradicular (Tang, Zhang, Mei *et al.* 2022). Na periodontite, a destruição óssea está relacionada a uma hiperestimulação dos osteoclastos devido a cronicidade de uma infecção. Além disso, o aumento da inflamação sistêmica acompanha o crescimento de microrganismos patogênicos relacionado a doenças crônicas bucais (Chen, Wu, Chang 2017, Zhao, Li, Su *et al.* 2020). As bactérias orais podem influenciar as respostas imunitárias e a patogênese de doenças fora da cavidade oral e sua capacidade de colonizar esses locais depende do estado de saúde bucal do hospedeiro (Sedghi, DiMassa, Harrington *et al.* 2021).

O *E. faecalis* é uma bacteriana Gram-positiva, anaeróbica facultativa que pode sobreviver sem nutrientes por vários meses (Bolhari, Sooratgar, Pourhajibagher *et al.* 2021), comumente encontrado em doenças crônicas bucais como nas infecções do canal radicular, na PA e PA persistente após tratamento, possuindo alta resistência a antibióticos além de serem capazes de sobreviver por longos períodos no interior dos canais radiculares, mesmo na presença de ambiente alcalino e de formar biofilmes maduros que invadem a região periapical e extrarradiculares (Dai, Ma, Jiang *et al.* 2022). Em um estudo clínico realizado com

pacientes com PA, verificou-se que cepas isoladas demonstraram alta resistência à tetraciclina, eritromicina, clindamicina e metronidazol, medicamentos comumente usados na odontologia, e que a persistência destas bactérias no interior do canal radicular, podem levar o tratamento endodôntico ao insucesso (Pazhouhnia, Bouzari, Arbabzadeh-Zavareh 2022).

Neste estudo a indução da PA em modelo animal de ratos Wistar, seguiu modelo previamente estabelecido (Simões, Netto, Generoso *et al.* 2019). Além disso, foi realizada a contaminação destas lesões periodontais com a bactéria *E. faecalis*, a fim de verificar seu envolvimento em neuroinflamação e alterações cognitivas em modelo experimental de PA.

Para confirmar o desenvolvimento da PA após a indução da lesão em 10 e 21 dias, foram realizadas as TCFC nos animais submetidos ao modelo experimental de PA contaminados com *E. faecalis* e salina (Barichello, Netto, Ceretta *et al.* 2015). Foi verificado através dos exames de TCFC que no 10º dia, não houve formação de PA nos grupos PA salina e *E. faecalis* ao passo que no 21º dia os animais do grupo PA salina e *E. faecallis* já possuíam volumes e tamanhos diferentes de PA formada. Em outro estudo, verificou-se que o estresse e a tensão aplicado sobre os tecidos dento alveolares, em 0 e 14 dias, foram similares as deformações do dente em condições normais. Entretanto, quando avaliada a lesão após 28 dias, os autores encontraram aumentos significativos no estresse e tensão que se refletem diretamente sobre os tecidos periodontais, durante os movimentos oclusais e favorecem o aumento das periodontites apicais (Peng, Ma, Cao *et al.* 2022). Outro estudo utilizando microtomografias encontrou resultados similares aos apresentados anteriormente, com imagens de PA visíveis após 14 dias, atingindo seu tamanho máximo em 28 dias, demonstrando uma correlação entre a atividade de reabsorção e a expansão da lesão (Minhoto, Khoury, Orozco *et al.* 2021). Assim, a biomecânica do dente é prejudicada durante o desenvolvimento da PA o que pode contribuir para a lenta destruição e desintegração da estrutura dental na região apical e enfraquecimento que podem levar a fratura dental (Huang, Xie, Xie *et al.* 2020).

Na verificação das dimensões das periodontites apical formada após 21 dias foi observado um aumento das lesões no sentido sagital (médio-distal), no grupo PA/ *E. faecalis* comparada ao grupo PA/ salina. O mesmo não aconteceu na medição no sentido axial (vestíbulo-lingual) onde o grupo PA/ *E. faecalis* teve menor

dimensão, enquanto no sentido (coronal) coroa-ápice houve resultados semelhantes nos grupos PA/ *E. faecalis*, quando comparado ao grupo PA/ salina. Estes resultados vão ao encontro do estudo de Mackiewicz e colaboradores (2023), onde após avaliarem o aumento das PAs, constataram que quanto maiores as dimensões da PA, maiores são os níveis de endotoxinas bacterianas e bactérias presentes no canal radicular e isto implica diretamente na dificuldade de reparo ósseo periapical após o tratamento (Mackiewicz, Bonsmann, Kaczor-Wiankowska *et al.* 2023).

Estudos relatam que a presença de doença inflamatória crônica, como PA, é provocada por bactérias anaeróbias e seus fatores de virulência, aumentando os níveis de mediadores inflamatórios na circulação sistêmica e levando a uma resposta imune específica resultando no aumento dos índices de reabsorção óssea na região apical (Díaz-Zúñiga, More, Melgar-Rodríguez *et al.* 2020). As PAs podem contribuir para inflamação sistêmica de baixo grau associada ao aumento generalizado de mediadores inflamatórios sistêmicos, como proteína C reativa (PCR), IL-1, IL-2, IL-6 e imunoglobulina (IgA, IgG e IgM) (Poornima, Ravishankar, Abbott *et al.* 2021). A associação entre a inflamação oral e sistêmica é essencial para compreender os prejuízos em longo prazo que podem ocorrer no comportamento sistêmico. Isto pode elucidar até que ponto as doenças orais podem aumentar o risco de desenvolvimento de doenças em outros órgãos e tecidos (Martínez-García, Hernández-Lemus 2021, Hajishengallis 2022).

Quanto ao volume em mm³ da PA induzida após 21 dias, neste estudo verificou-se que foi maior no grupo PA/ *E. faecalis* do que no grupo PA/ salina. Estes resultados vão ao encontro de outros estudos da literatura que indicam aumentos significativos no volume da lesão periapical entre 14 e 21 dias, seguido de estabilidade até 28 dias de exposição pulpar (Peng, Ma, Cao *et al.* 2022, Frazão, Santos Mendes, Baia-da-Silva *et al.* 2023).

Para a avaliação comportamental dos animais, o teste comportamental de reconhecimento de novos objetos foi realizado em 10 e 21 dias. Neste estudo verificou-se que os animais do grupo controle/ salina e controle/ *E. faecalis* utilizaram mais tempo para o reconhecimento do novo objeto na sessão teste comparada a sessão treino, o que indica que esses animais apresentaram memória de longo prazo. Entretanto nos grupos PA/ salina e PA/ *E. faecalis* não houve diferenças no índice de reconhecimento entre as sessões treino e teste, demonstrando mesmo tempo de exploração ao novo objeto e indicando uma redução na memória de longo

prazo dos animais. A utilização deste teste comportamental no modelo de PA foi pouco abordada, sendo este um dos poucos estudos que o utilizaram. O uso desse teste comportamental para avaliação de memória está bem consolidado, uma vez que não requer reforço ou punição para motivar o comportamento e não requer treinamento prolongado antes de poder ser realizado, evitando o estresse do animal e, portanto, sem alterações dos resultados (Wooden, Spinetta, Nguyen *et al.* 2021).

Neste estudo a expressão de GFAP e IBA1, marcadores de ativação microglial e astrocitária, foram avaliados no córtex pré-frontal, giro denteado hipocampal e região CA1 do hipocampo. O grupo controle/ *E. faecalis* apresentou aumento da expressão de GFAP somente no córtex pré-frontal. Todavia, os grupos PA/ salina e PA/ *E. faecalis* demonstraram aumento de GFAP em córtex pré-frontal, giro denteado hipocampal e região CA1 do hipocampo. Além disso, o grupo PA/ *E. faecalis* teve um aumento mais expressivo de IBA1 em região de giro denteado hipocampal e CA1 do hipocampo, quando comparado aos demais grupos.

Os patógenos periodontais desencadeiam aumento de mediadores inflamatórios no cérebro acarretando respostas neuroinflamatórias exacerbadas. Através de suas toxinas, podem induzir a ativação microglial e desencadear respostas inflamatórias periféricas locais ou sistêmicas, com produção de mediadores inflamatórios (como IL-1 β e TNF- α), que podem atravessar a barreira hematoencefálica através da circulação sistêmica e iniciar a neuroinflamação (Hao, Li, Li *et al.* 2022, Wang, Huang, Chan *et al.* 2023). Estudos realizados com modelos animais de PA verificaram um aumento do processo inflamatório no hipocampo de camundongos e ratos infectados por via oral com *Porphyromonas gingivalis* concomitante com níveis elevados de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Wu, Ni, Liu *et al.* 2017, Dominy, Lynch, Ermini *et al.* 2019). Esses resultados foram similares ao encontrados nesse estudo, em que os animais do grupo PA/ *E. faecalis* demonstraram mais ativação microglial e astrocitária na região de hipocampo, quando comparado aos demais grupos.

Outros parâmetros avaliados neste estudo foram os níveis de citocinas inflamatórias. Os mediadores inflamatórios podem ser encontrados tanto em indivíduos saudáveis quanto em indivíduos doentes e fazem parte da complexa resposta biológica dos tecidos corporais aos estímulos nocivos. Em geral, a concentração destes mediadores é menor na saúde do que na doença. A presença contínua destes marcadores em indivíduos saudáveis caracteriza uma inflamação

sistêmica, ou de baixo grau, estabelecendo uma ferramenta importante para medir o impacto das doenças orais na saúde sistêmica de um indivíduo (Georgiou, Crielaard, Ouwerling *et al.* 2021). Estas situações clínicas são caracterizadas pelo aumento dos níveis de PCR no soro e pela liberação de EROs, colagenase, serina proteases e regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α . Todas essas alterações biológicas resultam em maior progressão da inflamação periapical e comprometimento da sua cicatrização (Cintra, Gomes, da Silva *et al.* 2021, Herbst, Schwendicke, Krois *et al.* 2022).

Neste estudo os níveis de TNF- α estiveram aumentados nos grupos controle/ *E. faecalis*, PA/ salina e PA/ *E. faecalis* em todas as estruturas analisadas, quando comparado ao controle/ salina. Na avaliação da IL-1 β no LCR os níveis dessa citocina estiveram aumentados somente no grupo PA/ *E. faecalis* quando comparado com controle/ salina. Em hipocampo os níveis mantiveram-se altos nos grupos controle/ *E. faecalis* e PA/ *E. faecalis*. Em córtex frontal houve aumento nos grupos controle/ *E. faecalis*, PA/ salina e PA/ *E. faecalis* quando comparados ao controle/ salina. Além disso, houve aumento significativamente estatístico no grupo PA/ *E. faecalis* quando comparado ao grupo PA/ salina. Já os níveis de IL-6 demonstraram aumento nos grupos controle/ *E. faecalis*, PA/ salina e PA/ *E. faecalis* no hipocampo e córtex pré-frontal, no LCR os níveis estiveram aumentados somente no grupo PA/ *E. faecalis*. Com relação aos níveis de IL-10 não foi observado alterações significativas em nenhuma estrutura avaliada.

O TNF- α e IL-6 são citocinas inflamatórias comumente encontradas durante a PA, estimulam a diferenciação osteoclástica e a reabsorção óssea na periodontite inflamatória crônica e foram encontradas principalmente agrupadas ao redor do forame apical (Ye, Feng, Zhao *et al.* 2022). No presente estudo houve aumento dos níveis destas citocinas em quase todas as estruturas analisadas quando comparado aos grupos controles/ salina. Entretanto no LCR dos animais PA/ *E. faecalis* somente os níveis de IL-6 estiveram elevados.

Em particular os níveis de IL-1 β , foram significativamente maiores nos grupos com PA e contaminados com *E. faecalis* quando comparados ao grupo controle. O mesmo ocorreu quando comparados os grupos PA/ salina e PA/ *E. faecalis*, e esses achados foram consistentes com outro estudo que encontrou níveis elevados de IL-1 β , IL-6 em soro de pacientes com PA quando comparados aos grupos controles. Segundo os autores, o aumento da carga inflamatória sistêmica

causa reabsorção do tecido ósseo da região periapical (Garrido, Cárdenas, Astorga *et al.* 2019).

A citocina IL-10 é secretada pelas células imunes regulatórias e são os principais mensageiros, que induzem as respostas imunossupressoras nos tecidos inflamados. Em um estudo prévio, os níveis de IL-10 foram maiores nos indivíduos com PA em comparação com o grupo controle. Após a extração do elemento dental, causador da doença dentária, houve uma redução significativa desta citocina em ambos os grupos, demonstrando que o sistema imune tenta se recuperar e sair do estado de inflamação de baixo grau (Georgiou, Twisk, Crielaard *et al.* 2023). Neste estudo ao avaliar os níveis de IL-10 não foram observadas alterações significativas em nenhuma das estruturas avaliadas. Níveis significativamente maiores de citocinas inflamatórias em pacientes com PA quando comparados aos grupos controles sem periodontite, foram evidenciados e correlacionados ao aumento da carga inflamatória sistêmica (Bakhsh, Moyes, Proctor *et al.* 2022).

A prevalência de PA na população adulta é alta alcançando 6,3% nos dentes tratados endodonticamente e 41,3% em não tratados (Jakovljevic, Nikolic, Jacimovic *et al.* 2020). Além dos sinais clínicos já conhecidos como dor, desconforto e inchaço, bem como seus efeitos sistêmicos, o aumento de mediadores inflamatórios no sangue de indivíduos com PA também já foram investigados, sendo os valores de PCR, dimetilarginina assimétrica e IL-6 no sangue periférico mais elevado do que nos indivíduos controles (Georgiou, Crielaard, Armenis *et al.* 2019). Os mediadores inflamatórios são ativados pelas EROs que possuem papel sinalizador na resposta imune inata. O estresse oxidativo ocorre quando os níveis de EROs superam a capacidade das células de neutralizá-los por meio de mecanismos antioxidantes naturais (DeJulius, Dollinger, Kavanaugh *et al.* 2021).

Na cavidade oral, o estresse oxidativo é impulsionado por comunidades bacterianas específicas de cada indivíduo, como o *E. faecalis*, conhecido por induzir a produção de EROs (Jakovljevic, Nikolic, Jacimovic *et al.* 2020). Nas últimas décadas, surgiram evidências de que existe uma associação entre o aumento de radicais livres e várias doenças, incluindo doenças neurodegenerativas (como Alzheimer), vasculares (como aterosclerose) e reumáticas (Martínez-García, Hernández-Lemus 2021). Sem tratamento, pacientes assintomáticos acometidos com PA podem ter aumento da produção local de EROs e do consequente dano oxidativo durante anos, e considerando as consequências sistêmicas de longa

duração, sugere-se tratá-los assim que identificados (Tibúrcio-Machado, Michelon, Zanatta *et al.* 2021). Todos estes achados destacam o importante papel das EROs na cascata da resposta imunológica e que a sua produção é fundamental para o início e manutenção da resposta inflamatória. As EROs produzidas por células fagocitárias em respostas bacterianas, são um importante mecanismo de defesa do hospedeiro, e o aumento destas, contribui não somente na destruição óssea periapical, mas também para o efeito sistêmico (Georgiou, Cornejo Ulloa, Van Kessel *et al.* 2021).

Nesse estudo o dano oxidativo e defesa enzimática foram avaliados pelas técnicas de TBARS, carbonilação de proteínas, DCFH, SOD e CAT. Na avaliação da peroxidação lipídica em tecido cerebral houve aumento nos grupos PA/ salina e PA/ *E. faecalis* comparados ao grupo controle/ salina no LCR, hipocampo e córtex frontal. Esses resultados se assemelham a um estudo prévio, em que níveis aumentados de indicadores de estresse oxidativo, MDA, foram observados no hipocampo de camundongos infectados por outro patógeno bucal, o *P. gingivalis*. Além disso, a atividade de enzimas antioxidantes, SOD e glutathione peroxidase (GSH-Px), foram suprimidas (Liu, Wang, Guo *et al.* 2020). Outro estudo, com mesmo modelo experimental, verificou que a redução de antioxidantes enzimáticos como a glutathione redutase ocorre concomitantemente à progressão da inflamação crônica, restringindo assim a capacidade de reparar os danos causados pelos radicais livres. Além disso, o dano decorrente da peroxidação lipídica demonstrou níveis séricos mais elevados conforme a progressão do tempo de lesão, sugerindo um declínio na capacidade do corpo de neutralizar o estresse oxidativo e uma reação inflamatória amplificada que produz EROs (Frazão, Santos Mendes, Baia-da-Silva *et al.* 2023). Em um estudo clínico, que avaliou os níveis endotoxinas bacterianas em PAs e sua correlação com a depressão, houve uma forte associação positiva desses componentes com o desenvolvimento de PA crônica, depressão, e gravidade da depressão, bem como aumento sérico de produtos proteicos de oxidação avançada, metabólitos do óxido nítrico, e peroxidação lipídica, demonstrando o efeito sistêmico da doença (Gomes, Martinho, Barbosa *et al.* 2018).

Nesse estudo, a carbonilação de proteínas demonstrou um aumento nos grupos PA/ salina e PA/ *E. faecalis* comparados ao grupo controle/ salina em todas as estruturas. Além disso, os níveis mantiveram-se elevados no grupo PA/ *E. faecalis* em LCR quando comparado com controle/ *E. faecalis*. Outro parâmetro

avaliado foi a produção de EROs por DCFH, nos grupos PA/ salina e PA/ *E. faecalis* comparados ao grupo controle/ salina, com predominância no grupo PA/ *E. faecalis* em todos as estruturas avaliadas, quando comparado ao grupo PA/ salina. Já a atividade de SOD demonstrou aumento no grupo PA/ *E. faecalis* quando comparado com grupo controle/ salina em córtex frontal e a atividade de CAT demonstrou aumento no grupo PA/ *E. faecalis* quando comparado com grupo controle/ salina em córtex frontal e hipocampo.

A avaliação de parâmetros oxidativos no cérebro após PA possui limitações na literatura. Entretanto, sua avaliação em sangue (Berar, David, Lascu *et al.* 2015), coração, pâncreas, fígado e rim (Barcelos, Rosa, Roversi *et al.* 2020) já foram elucidados. De acordo com a origem infecciosa, as bactérias, fatores de virulência e mediadores pró-inflamatórios podem se espalhar para o sistema nervoso central através da circulação sistêmica ou dos nervos cerebrais e aumentar a carga inflamatória sistêmica, resultando em aumento de dano oxidativo (Martínez-García, Hernández-Lemus 2021). Doenças sistêmicas nas quais é induzida uma reação inflamatória maior, como ativação de NF- κ B em macrófagos e aumento do estresse oxidativo, podem alterar a remodelação óssea e o reparo periapical (Segura-Egea, Cabanillas-Balsera, Martín-González *et al.* 2023). Em um estudo prévio que avaliou o papel oxidativo periférico em modelo animal de PA, verificou-se redução das atividades da enzima antioxidante CAT e níveis de vitamina C cardíaca e pancreática, e seu aumento no fígado e rim demonstrando amplificação no seu consumo na desintoxicação do peróxido de hidrogênio (Barcelos, Rosa, Roversi *et al.* 2020).

O tratamento indicado nos indivíduos quando ocorre este tipo de infecção é a terapia do canal radicular ou tratamento endodôntico, que consiste na remoção completa das substâncias infecciosas e preenchimento hermético e tridimensional deste sistema de canais radiculares. Deste modo, ocorre o sepultamento das bactérias remanescentes impedindo a infecção secundária (Fan, Wang, Sun *et al.* 2022). O sucesso deste tratamento depende do comprometimento dos tecidos periapicais com uma possibilidade de reparo ou cicatrização apical em 86% dos casos. O tratamento endodôntico, tem como objetivo a remoção do biofilme no interior do canal radicular, através da limpeza químico-mecânica, que ocorre nas etapas de modelagem, medicação e obturação deste sistema seguida do selamento coronário definitivo (Abe, Honda 2023). Sendo assim, a persistência de biofilme

intrarradicular, afeta o resultado do tratamento, demonstrando que existem deficiências dentro do padrão ouro de tratamento endodôntico e sugerem a necessidade de estudar novas formas para erradicação do biofilme, visando melhorar a taxa de sucesso dos tratamentos com PA (Voit, Trampuz, Gonzalez Moreno 2022).

A necrose induzida por *E. faecalis* promove o desenvolvimento de PA refratária (PAR), com base na análise de amostras clínicas humanas, modelos animais e culturas celulares. Essa necrose contribui para a formação de microlesões cardíacas durante infecção bacteriana grave por *E. faecalis* em camundongos. Os macrófagos são importantes mediadores das respostas inflamatórias do hospedeiro à infecção e sua infiltração abundante foi verificada em amostras de lesões periapicais de pacientes com diagnóstico de PAR, bem como em modelo experimental, aumentando a expressão dos marcadores inflamatórios IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Sendo assim, a imunomodulação dessas células representa uma abordagem terapêutica potencial para prevenir lesões periapicais induzidas por *E. faecalis*.(Dai, Ma, Jiang *et al.* 2022).

6. CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível verificar que em 21 dias após o desenvolvimento de PA os animais apresentaram danos nas estruturas ósseas dentárias, características da doença, sendo os animais do grupo PA/ *E. faecalis* mais afetados e com maiores volumes de lesão. Além disso, os animais dos grupos periodontite apresentaram dano de memória quando comparados aos controles, com aumento expressivo de marcadores gliais nas estruturas córtex pré-frontal, giro denteado e região C1 do hipocampo nos animais infectados por *E. faecalis*. Com relação aos parâmetros inflamatórios, verificou-se que os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 estiveram exacerbados nos grupos PA/ *E. faecalis* quando comparado ao grupo PA/ salina. Com relação aos níveis de IL-10 não foram observadas alterações significativas em nenhuma estrutura avaliada. Na avaliação de parâmetros oxidativos, verificou-se aumento mais expressivo de peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e aumento de EROS no grupo PA/ *E. faecalis*.

Com estes resultados pressupõem-se que o processo infeccioso por *E. faecalis* exacerba parâmetros inflamatórios e oxidativos no SNC em modelo animal de PA, resultando em ativação microglial, e possível dano cerebral correlacionadas a danos comportamentais de memória e aprendizado.

REFERÊNCIAS

- Abe, Y. and Honda, M. "A Novel Control Method of *Enterococcus faecalis* by Co-Treatment with Protamine and Calcium Hydroxide." **Pharmaceutics**, 15(6). 2023.
- Abusrewil, S., Alshanta, O.A., Albashaireh, K., Alqahtani, S., Nile, C.J., Scott, J.A. and McLean, W. "Detection, treatment and prevention of endodontic biofilm infections: what's new in 2020?" **Crit Rev Microbiol**, 46(2): 194-212. 2020.
- Aebi, H. "Catalase in vitro." **Methods Enzymol**, 105: 121-126. 1984.
- Ali, A.H., Thani, F.B., Foschi, F., Banerjee, A. and Mannocci, F. "Self-Limiting versus Rotary Subjective Carious Tissue Removal: A Randomized Controlled Clinical Trial-2-Year Results." **J Clin Med**, 9(9). 2020.
- Antunes, H.S., Rôças, I.N., Alves, F.R. and Siqueira, J.F., Jr. "Total and Specific Bacterial Levels in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-treatment Apical Periodontitis." **J Endod**, 41(7): 1037-1042. 2015.
- Bakhsh, A., Moyes, D., Proctor, G., Mannocci, F. and Niazi, S.A. "The impact of apical periodontitis, non-surgical root canal retreatment and periapical surgery on serum inflammatory biomarkers." **Int Endod J**, 55(9): 923-937. 2022.
- Bannister, J.V. and Calabrese, L. "Assays for superoxide dismutase." **Methods Biochem Anal**, 32: 279-312. 1987.
- Barcelos, R.C.S., Rosa, H.Z., Roversi, K., Tibúrcio-Machado, C.D.S., Inchaki, P.T., Burger, M.E. and Bier, C.A.S. "Apical periodontitis induces changes on oxidative stress parameters and increases Na(+)/K(+)-ATPase activity in adult rats." **Arch Oral Biol**, 118: 104849. 2020.
- Barichello, T., Netto, S., Ceretta, R.A., Generoso, J.S., Simões, L.R., Ribeiro, P., Budni, J. and Quevedo, J. "Association between Experimental Bacterial Meningitis and Periapical Lesion." **J Clin Diagn Res**, 9(5): Df01-03. 2015.
- Berar, A.M., David, D.C., Lascu, L., Matros, L. and Campian, R.S. "Analysis of hematological and oxidative stress parameters in the evaluation of experimentally induced periapical lesions." **Human and Veterinary Medicine**, 7(3): 162-167. 2015.
- Bolhari, B., Sooratgar, A., Pourhajibagher, M., Chitsaz, N. and Hamraz, I. "Evaluation of the Antimicrobial Effect of Mineral Trioxide Aggregate Mixed with Fluorohydroxyapatite against *E. faecalis* In Vitro." **ScientificWorldJournal**, 2021: 6318690. 2021.
- Careddu, R. and Duncan, H.F. "A prospective clinical study investigating the effectiveness of partial pulpotomy after relating preoperative symptoms to a new and established classification of pulpitis." **Int Endod J**, 54(12): 2156-2172. 2021.

Chen, C.K., Wu, Y.T. and Chang, Y.C. "Association between chronic periodontitis and the risk of Alzheimer's disease: a retrospective, population-based, matched-cohort study." **Alzheimers Res Ther**, 9(1): 56. 2017.

Chen, S., Lei, H., Luo, Y., Jiang, S., Zhang, M., Lv, H., Cai, Z. and Huang, X. "Micro-CT analysis of chronic apical periodontitis induced by several specific pathogens." **Int Endod J**, 52(7): 1028-1039. 2019.

Cintra, L.T.A., Estrela, C., Azuma, M.M., Queiroz Í, O.A., Kawai, T. and Gomes-Filho, J.E. "Endodontic medicine: interrelationships among apical periodontitis, systemic disorders, and tissue responses of dental materials." **Braz Oral Res**, 32(suppl 1): e68. 2018.

Cintra, L.T.A., Gomes, M.S., da Silva, C.C., Faria, F.D., Benetti, F., Cosme-Silva, L., Samuel, R.O., Pinheiro, T.N., Estrela, C., González, A.C. and Segura-Egea, J.J. "Evolution of endodontic medicine: a critical narrative review of the interrelationship between endodontics and systemic pathological conditions." **Odontology**, 109(4): 741-769. 2021.

Cope, A., Francis, N., Wood, F., Mann, M.K. and Chestnutt, I.G. "Systemic antibiotics for symptomatic apical periodontitis and acute apical abscess in adults." **Cochrane Database Syst Rev**, (6): Cd010136. 2014.

Costa, F., Pacheco-Yanes, J., Siqueira, J.F., Jr., Oliveira, A.C.S., Gazzaneo, I., Amorim, C.A., Santos, P.H.B. and Alves, F.R.F. "Association between missed canals and apical periodontitis." **Int Endod J**, 52(4): 400-406. 2019.

Dai, X., Ma, R., Jiang, W., Deng, Z., Chen, L., Liang, Y., Shao, L. and Zhao, W. "Enterococcus faecalis-Induced Macrophage Necroptosis Promotes Refractory Apical Periodontitis." **Microbiol Spectr**, 10(4): e0104522. 2022.

de Lima, M.N., Laranja, D.C., Bromberg, E., Roesler, R. and Schröder, N. "Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats." **Behav Brain Res**, 156(1): 139-143. 2005.

DeJulius, C.R., Dollinger, B.R., Kavanaugh, T.E., Dailing, E., Yu, F., Gulati, S., Miskalis, A., Zhang, C., Uddin, J., Dikalov, S. and Duvall, C.L. "Optimizing an Antioxidant TEMPO Copolymer for Reactive Oxygen Species Scavenging and Anti-Inflammatory Effects in Vivo." **Bioconjug Chem**, 32(5): 928-941. 2021.

Deng, Z., Lin, B., Liu, F. and Zhao, W. "Role of Enterococcus faecalis in refractory apical periodontitis: from pathogenicity to host cell response." **J Oral Microbiol**, 15(1): 2184924. 2023.

Díaz-Zúñiga, J., More, J., Melgar-Rodríguez, S., Jiménez-Unión, M., Villalobos-Orchard, F., Muñoz-Manríquez, C., Monasterio, G., Valdés, J.L., Vernal, R. and Paula-Lima, A. "Alzheimer's Disease-Like Pathology Triggered by Porphyromonas gingivalis in Wild Type Rats Is Serotype Dependent." **Front Immunol**, 11: 588036. 2020.

Dioguardi, M., Di Gioia, G., Illuzzi, G., Arena, C., Caponio, V.C.A., Caloro, G.A., Zhurakivska, K., Adipietro, I., Troiano, G. and Lo Muzio, L. "Inspection of the Microbiota in Endodontic Lesions." **Dent J (Basel)**, 7(2). 2019.

Dominy, S.S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., Konradi, A., Nguyen, M., Haditsch, U., Raha, D., Griffin, C., Holsinger, L.J., Arastu-Kapur, S., Kaba, S., Lee, A., Ryder, M.I., Potempa, B., Mydel, P., Hellvard, A., Adamowicz, K., Hasturk, H., Walker, G.D., Reynolds, E.C., Faull, R.L.M., Curtis, M.A., Dragunow, M. and Potempa, J. "Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors." **Sci Adv**, 5(1): eaau3333. 2019.

Dong, M., Jin, H., Zuo, M., Bai, H., Wang, L., Shi, C. and Niu, W. "The potential effect of Bruton's tyrosine kinase in refractory periapical periodontitis." **Biomed Pharmacother**, 112: 108710. 2019.

Draper, H.H. and Hadley, M. "Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation." **Methods Enzymol**, 186: 421-431. 1990.

Dziedzic, A. "Is Periodontitis Associated with Age-Related Cognitive Impairment? The Systematic Review, Confounders Assessment and Meta-Analysis of Clinical Studies." **Int J Mol Sci**, 23(23). 2022.

El Ouarti, I., Chala, S., Sakout, M. and Abdallaoui, F. "Prevalence and risk factors of Apical periodontitis in endodontically treated teeth: cross-sectional study in an Adult Moroccan subpopulation." **BMC Oral Health**, 21(1): 124. 2021.

Elashiry, M.M., Bergeron, B.E. and Tay, F.R. "Enterococcus faecalis in secondary apical periodontitis: Mechanisms of bacterial survival and disease persistence." **Microbial Pathogenesis**, 183: 106337. 2023.

Fan, Y., Wang, Z., Sun, Y., Guo, X., Wang, H., Xu, H.H.K., Wang, S., Zhou, X., Li, B. and Cheng, L. "Effect of the Modified Methacrylate-Based Root Canal Sealer in Single-Cone Technique." **Nanomaterials (Basel)**, 12(21). 2022.

Fiallos, N.M., Ribeiro Aguiar, A.L., da Silva, B.N., Pergentino, M.L.M., Rocha, M.F.G., Sidrim, J.J.C., Maia, D. and Cordeiro, R.A. "The Potential of Phenothiazines against Endodontic Pathogens: A Focus on Enterococcus-Candida Dual-Species Biofilm." **Antibiotics (Basel)**, 11(11). 2022.

Frazão, D.R., Santos Mendes, P.F., Baia-da-Silva, D.C., Mendonça de Moura, J.D., Neves Dos Santos, V.R., Matos-Sousa, J.M., de Souza Balbinot, G., Guimarães, D.M., Collares, F.M. and Lima, R.R. "Modulation of blood redox status by the progression of induced apical periodontitis in rats." **Front Physiol**, 14: 1214990. 2023.

Gaeta, C., Marruganti, C., Ali, I.A.A., Fabbro, A., Pinzauti, D., Santoro, F., Neelakantan, P., Pozzi, G. and Grandini, S. "The presence of Enterococcus faecalis in saliva as a risk factor for endodontic infection." **Front Cell Infect Microbiol**, 13: 1061645. 2023.

Galler, K.M., Weber, M., Korkmaz, Y., Widbiller, M. and Feuerer, M. "Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues." **Int J Mol Sci**, 22(3). 2021.

Garrido, M., Cárdenas, A.M., Astorga, J., Quinlan, F., Valdés, M., Chaparro, A., Carvajal, P., Pussinen, P., Huamán-Chipana, P., Jalil, J.E. and Hernández, M. "Elevated Systemic Inflammatory Burden and Cardiovascular Risk in Young Adults with Endodontic Apical Lesions." **J Endod**, 45(2): 111-115. 2019.

Georgiou, A.C., Cornejo Ulloa, P., Van Kessel, G.M.H., Crielaard, W. and Van der Waal, S.V. "Reactive oxygen species can be traced locally and systemically in apical periodontitis: A systematic review." **Arch Oral Biol**, 129: 105167. 2021.

Georgiou, A.C., Crielaard, W., Armenis, I., de Vries, R. and van der Waal, S.V. "Apical Periodontitis Is Associated with Elevated Concentrations of Inflammatory Mediators in Peripheral Blood: A Systematic Review and Meta-analysis." **J Endod**, 45(11): 1279-1295.e1273. 2019.

Georgiou, A.C., Crielaard, W., Ouwering, P., McLean, W., Lappin, D.F. and van der Waal, S.V. "The influence of apical periodontitis on the concentration of inflammatory mediators in peripheral blood plasma and the metagenomic profiling of endodontic infections: Study design and protocol." **Contemp Clin Trials Commun**, 21: 100686. 2021.

Georgiou, A.C., Twisk, J.W.R., Crielaard, W., Ouwering, P., Schoneveld, A.H. and van der Waal, S.V. "The influence of apical periodontitis on circulatory inflammatory mediators in peripheral blood: A prospective case-control study." **Int Endod J**, 56(2): 130-145. 2023.

Gholizadeh, P., Aghazadeh, M., Ghotaslou, R., Rezaee, M.A., Pirzadeh, T., Cui, L., Watanabe, S., Feizi, H., Kadkhoda, H. and Kafil, H.S. "Role of CRISPR-Cas system on antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis*." **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, 20(1): 49. 2021.

Giridharan, V.V., Generoso, J.S., Collodel, A., Dominguni, D., Faller, C.J., Tardin, F., Bhatti, G.S., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F. and Barichello, T. "Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Mediates Cognitive Impairment Triggered by Pneumococcal Meningitis." **Neurotherapeutics**, 18(1): 640-653. 2021.

Gomes, C., Martinho, F.C., Barbosa, D.S., Antunes, L.S., Póvoa, H.C.C., Baltus, T.H.L., Morelli, N.R., Vargas, H.O., Nunes, S.O.V., Anderson, G. and Maes, M. "Increased Root Canal Endotoxin Levels are Associated with Chronic Apical Periodontitis, Increased Oxidative and Nitrosative Stress, Major Depression, Severity of Depression, and a Lowered Quality of Life." **Mol Neurobiol**, 55(4): 2814-2827. 2018.

Guan, X., He, Y., Wei, Z., Shi, C., Li, Y., Zhao, R., Pan, L., Han, Y., Hou, T. and Yang, J. "Crosstalk between Wnt/ β -catenin signaling and NF- κ B signaling contributes to apical periodontitis." **Int Immunopharmacol**, 98: 107843. 2021.

Hajishengallis, G. "Interconnection of periodontal disease and comorbidities: Evidence, mechanisms, and implications." **Periodontol 2000**, 89(1): 9-18. 2022.

Hajishengallis, G. and Chavakis, T. "Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities." **Nat Rev Immunol**, 21(7): 426-440. 2021.

Hao, X., Li, Z., Li, W., Katz, J., Michalek, S.M., Barnum, S.R., Pozzo-Miller, L., Saito, T., Saido, T.C., Wang, Q., Roberson, E.D. and Zhang, P. "Periodontal Infection Aggravates C1q-Mediated Microglial Activation and Synapse Pruning in Alzheimer's Mice." **Front Immunol**, 13: 816640. 2022.

Herbst, C.S., Schwendicke, F., Krois, J. and Herbst, S.R. "Association between patient-, tooth- and treatment-level factors and root canal treatment failure: A retrospective longitudinal and machine learning study." **J Dent**, 117: 103937. 2022.

Howait, M., Albassam, A., Yamada, C., Sasaki, H., Bahammam, L., Azuma, M.M., Cintra, L.T.A., Satoskar, A.R., Yamada, S., White, R., Kawai, T. and Movila, A. "Elevated Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes Inflammatory Bone Resorption Induced in a Mouse Model of Periradicular Periodontitis." **J Immunol**, 202(7): 2035-2043. 2019.

Huang, H.Y., Wang, W.C., Lin, P.Y., Huang, C.P., Chen, C.Y. and Chen, Y.K. "The roles of autophagy and hypoxia in human inflammatory periapical lesions." **Int Endod J**, 51 Suppl 2: e125-e145. 2018.

Huang, X., Xie, M., Xie, Y., Mei, F., Lu, X., Li, X. and Chen, L. "The roles of osteocytes in alveolar bone destruction in periodontitis." **J Transl Med**, 18(1): 479. 2020.

Jakovljevic, A., Nikolic, N., Jacimovic, J., Pavlovic, O., Milicic, B., Beljic-Ivanovic, K., Miletic, M., Andric, M. and Milasin, J. "Prevalence of Apical Periodontitis and Conventional Nonsurgical Root Canal Treatment in General Adult Population: An Updated Systematic Review and Meta-analysis of Cross-sectional Studies Published between 2012 and 2020." **J Endod**, 46(10): 1371-1386.e1378. 2020.

Jiang, W., Deng, Z., Dai, X. and Zhao, W. "PANoptosis: A New Insight Into Oral Infectious Diseases." **Front Immunol**, 12: 789610. 2021.

Jiao, Y., Tay, F.R., Niu, L.N. and Chen, J.H. "Advancing antimicrobial strategies for managing oral biofilm infections." **Int J Oral Sci**, 11(3): 28. 2019.

Kalatzis-Sousa, N.G., Spin-Neto, R., Wenzel, A., Tanomaru-Filho, M. and Faria, G. "Use of micro-computed tomography for the assessment of periapical lesions in small rodents: a systematic review." **Int Endod J**, 50(4): 352-366. 2017.

Kantarci, A., Tognoni, C.M., Yaghmoor, W., Marghalani, A., Stephens, D., Ahn, J.Y., Carreras, I. and Dedeoglu, A. "Microglial response to experimental periodontitis in a murine model of Alzheimer's disease." **Sci Rep**, 10(1): 18561. 2020.

Kanzaki, H., Wada, S., Narimiya, T., Yamaguchi, Y., Katsumata, Y., Itohiya, K., Fukaya, S., Miyamoto, Y. and Nakamura, Y. "Pathways that Regulate ROS Scavenging Enzymes, and Their Role in Defense Against Tissue Destruction in Periodontitis." **Front Physiol**, 8: 351. 2017.

Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H. and Thurnheer, T. "Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities." **Trends Microbiol**, 28(8): 668-681. 2020.

Khandelwal, A., Janani, K., Teja, K., Jose, J., Battineni, G., Riccitiello, F., Valletta, A., Palanivelu, A. and Spagnuolo, G. "Periapical Healing following Root Canal Treatment Using Different Endodontic Sealers: A Systematic Review." **Biomed Res Int**, 2022: 3569281. 2022.

Kundra, S., Lam, L.N., Kajfasz, J.K., Casella, L.G., Andersen, M.J., Abranches, J., Flores-Mireles, A.L. and Lemos, J.A. "c-di-AMP Is Essential for the Virulence of Enterococcus faecalis." **Infect Immun**, 89(11): e0036521. 2021.

Larsen, T. and Fiehn, N.E. "Dental biofilm infections - an update." **Apmis**, 125(4): 376-384. 2017.

LeBel, C.P. and Bondy, S.C. "Oxidative damage and cerebral aging." **Progress in Neurobiology**, 38(6): 601-609. 1992.

Leblhuber, F., Ehrlich, D., Steiner, K., Geisler, S., Fuchs, D., Lanser, L. and Kurz, K. "The Immunopathogenesis of Alzheimer's Disease Is Related to the Composition of Gut Microbiota." **Nutrients**, 13(2). 2021.

Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S. and Stadtman, E.R. "Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins." **Methods Enzymol**, 186: 464-478. 1990.

Li, X., Liu, Y., Yang, X., Li, C. and Song, Z. "The Oral Microbiota: Community Composition, Influencing Factors, Pathogenesis, and Interventions." **Front Microbiol**, 13: 895537. 2022.

Li, Y., Wang, Z., Bao, P., Meng, T., Liu, M., Li, H., Shen, Y., Liu, D., Jia, Z. and Liu, H. "Cleaning and Disinfecting Oval-Shaped Root Canals: Ex Vivo Evaluation of Three Rotary Instrumentation Systems with Passive Ultrasonic Irrigation." **Medicina (Kaunas)**, 59(5). 2023.

Lin, Y., Xing, Q., Qin, W., de Melo, M.A.S., Zou, R., Xu, M., Zhang, X., Xu, H.H.K. and Lin, Z. "Decreased Expression of Semaphorin3A/Neuropilin-1 Signaling Axis in Apical Periodontitis." **Biomed Res Int**, 2017: 8724503. 2017.

Lissi, E., Salim-Hanna, M., Pascual, C. and del Castillo, M.D. "Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements." **Free Radic Biol Med**, 18(2): 153-158. 1995.

Liu, J., Wang, Y., Guo, J., Sun, J. and Sun, Q. "Salvianolic Acid B improves cognitive impairment by inhibiting neuroinflammation and decreasing A β level in Porphyromonas gingivalis-infected mice." **Aging (Albany NY)**, 12(11): 10117-10128. 2020.

Liu, L., Wang, L., Wu, Y. and Peng, B. "The expression of MCP-1 and CCR2 in induced rats periapical lesions." **Arch Oral Biol**, 59(5): 492-499. 2014.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. "Protein measurement with the Folin phenol reagent." **J Biol Chem**, 193(1): 265-275. 1951.

Lu, B., Zhang, J., Huang, X., Xiao, S., Zhang, M. and Cai, Z. "Expression of Interleukin-1 β and Matrix Metalloproteinase-8 in Cytolytic and Noncytolytic Enterococcus faecalis-induced Persistent Apical Periodontitis: A Comparative Study in the Rat." **J Endod**, 41(8): 1288-1293. 2015.

Lukic, D., Karygianni, L., Flury, M., Attin, T. and Thurnheer, T. "Endodontic-Like Oral Biofilms as Models for Multispecies Interactions in Endodontic Diseases." **Microorganisms**, 8(5). 2020.

Mackiewicz, E., Bonsmann, T., Kaczor-Wiankowska, K. and Nowicka, A. "Volumetric Assessment of Apical Periodontitis Using Cone-Beam Computed Tomography-A Systematic Review." **Int J Environ Res Public Health**, 20(4). 2023.

Maitre, Y., Mahalli, R., Micheneau, P., Delpierre, A., Amador, G. and Denis, F. "Evidence and Therapeutic Perspectives in the Relationship between the Oral Microbiome and Alzheimer's Disease: A Systematic Review." **Int J Environ Res Public Health**, 18(21). 2021.

Martínez-García, M. and Hernández-Lemus, E. "Periodontal Inflammation and Systemic Diseases: An Overview." **Front Physiol**, 12: 709438. 2021.

Minhoto, G.B., Khoury, R.D., Orozco, E.I.F., Prado, R.F. and Valera, M.C. "Effect of chronic unpredictable stress on the progression of experimental apical periodontitis in rats." **Int Endod J**, 54(8): 1342-1352. 2021.

Naruse, H., Itoh, S., Itoh, Y., Kagioka, T., Abe, M. and Hayashi, M. "The Wnt/ β -catenin signaling pathway has a healing ability for periapical periodontitis." **Sci Rep**, 11(1): 19673. 2021.

Neelakantan, P., Romero, M., Vera, J., Daood, U., Khan, A.U., Yan, A. and Cheung, G.S.P. "Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions." **Int J Mol Sci**, 18(8). 2017.

Oh, H.K., Hwang, Y.J., Hong, H.W. and Myung, H. "Comparison of Enterococcus faecalis Biofilm Removal Efficiency among Bacteriophage PBEF129, Its Endolysin, and Cefotaxime." **Viruses**, 13(3). 2021.

Omi, M. and Mishina, Y. "Roles of osteoclasts in alveolar bone remodeling." **Genesis**, 60(8-9): e23490. 2022.

Park, O.J., Ha, Y.E., Sim, J.R., Lee, D., Lee, E.H., Kim, S.Y., Yun, C.H. and Han, S.H. "Butyrate potentiates Enterococcus faecalis lipoteichoic acid-induced inflammasome activation via histone deacetylase inhibition." **Cell Death Discov**, 9(1): 107. 2023.

Park, O.J., Kim, A.R., So, Y.J., Im, J., Ji, H.J., Ahn, K.B., Seo, H.S., Yun, C.H. and Han, S.H. "Induction of Apoptotic Cell Death by Oral Streptococci in Human Periodontal Ligament Cells." **Front Microbiol**, 12: 738047. 2021.

Pazhouhnia, S., Bouzari, M. and Arbabzadeh-Zavareh, F. "Isolation, characterization and complete genome analysis of a novel bacteriophage vB_EfaS-SRH2 against Enterococcus faecalis isolated from periodontitis patients." **Sci Rep**, 12(1): 13268. 2022.

Peng, M., Ma, X., Cao, Y., Wang, C., Tan, Q., Chu, X., Zhou, P., Fu, T., Liang, P., Ran, S., He, T.C., Wang, J. and Huang, E. "Comparison of the biomechanical differences in the occlusal movement of wild-type and BMP9 knockout mice with apical periodontitis." **Front Bioeng Biotechnol**, 10: 1036061. 2022.

Poornima, L., Ravishankar, P., Abbott, P.V., Subbiya, A. and PradeepKumar, A.R. "Impact of root canal treatment on high-sensitivity C-reactive protein levels in systemically healthy adults with apical periodontitis - a preliminary prospective, longitudinal interventional study." **Int Endod J**, 54(4): 501-508. 2021.

Rodrigues, C.T., de Andrade, F.B., de Vasconcelos, L., Midena, R.Z., Pereira, T.C., Kuga, M.C., Duarte, M.A.H. and Bernardineli, N. "Antibacterial properties of silver nanoparticles as a root canal irrigant against Enterococcus faecalis biofilm and infected dentinal tubules." **Int Endod J**, 51(8): 901-911. 2018.

Scarparo, R.K., Dondoni, L., Böttcher, D.E., Grecca, F.S., Rockenbach, M.I. and Batista, E.L., Jr. "Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars." **J Endod**, 37(8): 1069-1073. 2011.

Sedghi, L., DiMassa, V., Harrington, A., Lynch, S.V. and Kapila, Y.L. "The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease." **Periodontol 2000**, 87(1): 107-131. 2021.

Segura-Egea, J.J., Cabanillas-Balsera, D., Martín-González, J. and Cintra, L.T.A. "Impact of systemic health on treatment outcomes in endodontics." **Int Endod J**, 56 Suppl 2: 219-235. 2023.

Shah, A., Lee, D., Song, M., Kim, S., Kang, M.K. and Kim, R.H. "Clastic cells are absent around the root surface in pulp-exposed periapical periodontitis lesions in mice." **Oral Dis**, 24(1-2): 57-62. 2018.

Shoemark, D.K. and Allen, S.J. "The microbiome and disease: reviewing the links between the oral microbiome, aging, and Alzheimer's disease." **J Alzheimers Dis**, 43(3): 725-738. 2015.

Simões, L.R., Netto, S., Generoso, J.S., Ceretta, R.A., Valim, R.F., Domingui, D., Michels, M., Réus, G.Z., Valvassori, S.S., Dal-Pizzol, F. and Barichello, T. "Imipramine treatment reverses depressive- and anxiety-like behaviors, normalize adrenocorticotrophic hormone, and reduces interleukin-1 β in the brain of rats subjected to experimental periapical lesion." **Pharmacol Rep**, 71(1): 24-31. 2019.

Siqueira, J.F., Jr. and Rôças, I.N. "Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections." **Int Endod J**, 55 Suppl 3: 512-530. 2022.

Tang, S., Zhang, H., Mei, L., Dou, K., Jiang, Y., Sun, Z., Wang, S., Hasanin, M.S., Deng, J. and Zhou, Q. "Fucoidan-derived carbon dots against *Enterococcus faecalis* biofilm and infected dentinal tubules for the treatment of persistent endodontic infections." **J Nanobiotechnology**, 20(1): 321. 2022.

Tang, Y., Zhou, X., Gao, B., Xu, X., Sun, J., Cheng, L., Zhou, X. and Zheng, L. "Modulation of Wnt/ β -catenin signaling attenuates periapical bone lesions." **J Dent Res**, 93(2): 175-182. 2014.

Tibúrcio-Machado, C.S., Michelon, C., Zanatta, F.B., Gomes, M.S., Marin, J.A. and Bier, C.A. "The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis." **Int Endod J**, 54(5): 712-735. 2021.

Tüfenkçi, P. and Yılmaz, K. "The Effects of Different Endodontic Access Cavity Design and Using XP-endo Finisher on the Reduction of *Enterococcus faecalis* in the Root Canal System." **J Endod**, 46(3): 419-424. 2020.

Tzeng, N.S., Chung, C.H., Yeh, C.B., Huang, R.Y., Yuh, D.Y., Huang, S.Y., Lu, R.B., Chang, H.A., Kao, Y.C., Chiang, W.S., Chou, Y.C. and Chien, W.C. "Are Chronic Periodontitis and Gingivitis Associated with Dementia? A Nationwide, Retrospective, Matched-Cohort Study in Taiwan." **Neuroepidemiology**, 47(2): 82-93. 2016.

Velázquez-Moreno, S., González-Amaro, A.M., Aragón-Piña, A., López-López, L.I., Sánchez-Sánchez, R., Pérez-Díaz, M.A., Oliva Rodríguez, R., Lorenzo-Leal, A.C., González-Ortega, O., Martínez-Gutierrez, F. and Bach, H. "Use of a Cellulase from *Trichoderma reesei* as an Adjuvant for *Enterococcus faecalis* Biofilm Disruption in Combination with Antibiotics as an Alternative Treatment in Secondary Endodontic Infection." **Pharmaceutics**, 15(3). 2023.

Vieira, G.C.S., Pérez, A.R., Alves, F.R.F., Provenzano, J.C., Mdala, I., Siqueira, J.F., Jr. and Rôças, I.N. "Impact of Contracted Endodontic Cavities on Root Canal Disinfection and Shaping." **J Endod**, 46(5): 655-661. 2020.

Virtej, A., Papadakou, P., Sasaki, H., Bletsas, A. and Berggreen, E. "VEGFR-2 reduces while combined VEGFR-2 and -3 signaling increases inflammation in apical periodontitis." **J Oral Microbiol**, 8: 32433. 2016.

Voit, M., Trampuz, A. and Gonzalez Moreno, M. "In Vitro Evaluation of Five Newly Isolated Bacteriophages against *E. faecalis* Biofilm for Their Potential Use against Post-Treatment Apical Periodontitis." **Pharmaceutics**, 14(9). 2022.

Wang, L., Jin, H., Ao, X., Dong, M., Liu, S., Lu, Y. and Niu, W. "JAK2-STAT3 signaling pathway is involved in rat periapical lesions induced by *Enterococcus faecalis*." **Oral Dis**, 25(7): 1769-1779. 2019.

Wang, L., Zhang, H., Dong, M., Zuo, M., Liu, S., Lu, Y. and Niu, W. "Role of the Btk-PLC γ 2 Signaling Pathway in the Bone Destruction of Apical Periodontitis." **Mediators Inflamm**, 2019: 8767529. 2019.

Wang, R.P., Huang, J., Chan, K.W.Y., Leung, W.K., Goto, T., Ho, Y.S. and Chang, R.C. "IL-1 β and TNF- α play an important role in modulating the risk of periodontitis and Alzheimer's disease." **J Neuroinflammation**, 20(1): 71. 2023.

Wei, W., Li, J., Liu, X., Pan, W., Wang, M., Li, J., Yue, Y. and Hao, L. "Inhibition of RGS10 Aggravates Periapical Periodontitis via Upregulation of the NF- κ B Pathway." **J Endod**, 48(10): 1308-1318.e1305. 2022.

Willett, J.L.E., Dale, J.L., Kwiatkowski, L.M., Powers, J.L., Korir, M.L., Kohli, R., Barnes, A.M.T. and Dunny, G.M. "Comparative Biofilm Assays Using *Enterococcus faecalis* OG1RF Identify New Determinants of Biofilm Formation." **mBio**, 12(3): e0101121. 2021.

Wooden, J.I., Spinetta, M.J., Nguyen, T., O'Leary, C.I. and Leasure, J.L. "A Sensitive Homeage-Based Novel Object Recognition Task for Rodents." **Front Behav Neurosci**, 15: 680042. 2021.

Wu, Z., Ni, J., Liu, Y., Teeling, J.L., Takayama, F., Collcutt, A., Ibbett, P. and Nakanishi, H. "Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in mice." **Brain Behav Immun**, 65: 350-361. 2017.

Xia, M., Zhuo, N., Ren, S., Zhang, H., Yang, Y., Lei, L. and Hu, T. "Enterococcus faecalis rnc gene modulates its susceptibility to disinfection agents: a novel approach against biofilm." **BMC Oral Health**, 22(1): 416. 2022.

Xiao, L., Zhou, Y., Zhu, L., Yang, S., Huang, R., Shi, W., Peng, B. and Xiao, Y. "SPHK1-S1PR1-RANKL Axis Regulates the Interactions Between Macrophages and BMSCs in Inflammatory Bone Loss." **J Bone Miner Res**, 33(6): 1090-1104. 2018.

Yang, M., Shen, Z., Zhang, X., Song, Z., Zhang, Y., Lin, Z. and Chen, L. "Ferroptosis of macrophages facilitates bone loss in apical periodontitis via NRF2/FSP1/ROS pathway." **Free Radic Biol Med**, 208: 334-347. 2023.

Ye, Q., Feng, Y., Zhao, Y.Q., Tan, L., Hu, J., Zhang, S.H., Zhao, J., Zhou, Y.H., Guo, Y. and Feng, Y.Z. "Comparison of EASYDO ACTIVATOR, passive ultrasonic, and needle irrigation techniques on the treatment of apical periodontitis: a study in rats." **Clin Oral Investig**, 26(12): 7157-7165. 2022.

Yin, W., Liu, S., Dong, M., Liu, Q., Shi, C., Bai, H., Wang, Q., Yang, X., Niu, W. and Wang, L. "A New NLRP3 Inflammasome Inhibitor, Dioscin, Promotes Osteogenesis." **Small**, 16(1): e1905977. 2020.

Zhao, Y., Li, Z., Su, L., Ballesteros-Tato, A., Katz, J., Michalek, S.M., Feng, X. and Zhang, P. "Characterization and regulation of osteoclast precursors following chronic Porphyromonas gingivalis infection." **J Leukoc Biol**, 108(4): 1037-1050. 2020.

ANEXO A – Certificado de aprovação CEUA



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **14/06/2022**.

| | |
|---|--|
| Título do projeto | Avaliação da neuroinflamação e de parâmetros comportamentais em modelo de lesão periapical com <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Streptococcus mutans</i> em ratos Wistar adultos machos e fêmeas. |
| Project title | Evaluation of neuroinflammation and behavioral parameters in a periapical lesion model with <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Streptococcus mutans</i> in adult male and female Wistar rats. |
| Número do protocolo Protocol number | 37/2022 |
| Pesquisador principal Principal Investigator | Tatiana Barichello |
| Pesquisadores Researchers | Jaqueline da Silva Generoso, Karina Marcon, Soraia Netto, Elisa Tassi Mondardo, Renan Antonio Ceretta, Diogo Dominguíni, Daniel Paulo Bortoluzzi. |
| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 15/06/2022 a 15/06/2023 |
| Espécie/linhagem/raça | Rato heterogênico / Wistar |
| Idade/Peso | 60 dias / 250 – 300g |
| Número de animais | Feminino 324 e Masculino 162 = 486 |
| Procedência | Biotério UNESC |

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma-SC, 14 de junho de 2022

Josiane Budni

Coordenadora da CEUA