

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

**KARINA MARCON MEZZARI**

**EFEITOS DA PERIODONTITE APICAL EXPERIMENTAL  
CONTAMINADA COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS* SOBRE  
ÓRGÃOS PERIFÉRICOS DE RATOS WISTAR ADULTOS**

**CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2024**

**KARINA MARCON MEZZARI**

**EFEITOS DA PERIODONTITE APICAL EXPERIMENTAL  
CONTAMINADA COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS* SOBRE  
ÓRGÃOS PERIFÉRICOS DE RATOS WISTAR ADULTOS**

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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Barichello  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jaqueline da Silva  
Generoso

**CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M617e Mezzari, Karina Marcon.

Efeitos da periodontite apical experimental contaminada com *Enterococcus faecalis* sobre órgãos periféricos de ratos Wistar adultos / Karina Marcon Mezzari. - 2024.

83 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. Neurodegeneração. 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 21 (vinte e um) do mês de outubro de 2024, às 13 (treze) horas e 30 (trinta) minutos, na Sala 107/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: **“EFEITOS DA PERIODONTITE APICAL CRÔNICA EXPERIMENTAL CONTAMINADA COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS* SOBRE ALTERAÇÕES PERIFÉRICAS DE RATOS WISTAR ADULTOS”**, da candidata **Karina Marcon Mezzari**. A Banca examinadora foi composta pelos(as) professores(as): **Dra. Cinara Ludvig Gonçalves** (Membro Relator – UNESC), **Dra. Gislaine Zilli Réus** (Membro Interno – UNESC), **Dra. Fernanda de Oliveira Meller** (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, 21 de outubro de 2024.

Documento assinado digitalmente  
**CINARA LUDVIG GONÇALVES**  
Data: 22/10/2024 15:58:22-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. CINARA LUDVIG GONÇALVES**  
Membro Relator – UNESC

Documento assinado digitalmente  
**GISLAINE ZILLI REUS**  
Data: 23/10/2024 14:16:10-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. GISLAINE ZILLI RÉUS**  
Membro Interno – UNESC

Documento assinado digitalmente  
**FERNANDA DE OLIVEIRA MELLER**  
Data: 22/10/2024 16:18:07-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Profa. Dra. FERNANDA DE OLIVEIRA MELLER**  
Membro Externo – UNESC

Documento assinado digitalmente  
**TATIANI BELLETTINI DOS SANTOS**  
Data: 21/10/2024 16:55:30-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

TATIANA  
BARICHELLO:5753431  
4968  
Assinado de forma digital por  
TATIANA  
BARICHELLO:57534314968  
Dados: 2024.12.02 16:02:48 -03'00'

**Profa. Dra. TATIANA BARICHELLO**  
Orientador(a)

Documento assinado digitalmente  
**EMILIO LUIZ STRECK**  
Data: 03/12/2024 13:13:12-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

**Prof. Dr. EMILIO LUIZ STRECK**  
Coordenador 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 este trabalho à minha querida e amada filha Chiara, meu anjo que me  
protege do céu.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, a fonte de toda força e sabedoria. Em todos os momentos, tanto nos dias de alegria quanto nas dificuldades, senti Sua presença guiando e cada um dos meus passos. É Sua graça que me sustentou e me deu perseverança para concluir esta jornada. A Ele, minha gratidão eterna por iluminar meu caminho.

Aos meus pais, Nelso e Pedra, devo tudo o que sou. Vocês me deram as bases necessárias para acreditar em mim mesma e alcançar meus objetivos. Seus exemplos de trabalho, amor e dedicação são uma constante fonte de inspiração para mim. Obrigada por me ensinarem a lutar pelos meus sonhos e, sobretudo, por estarem ao meu lado em cada desafio, sempre prontos com palavras de apoio, carinho e compreensão. Nada disso seria possível sem o suporte e os ensinamentos que recebi de vocês ao longo da minha vida.

Aos meus queridos irmãos, Alex, Fernanda e Andrei, sou imensamente grata pela companhia e pelo encorajamento ao longo desta jornada. Vocês foram meu porto seguro em muitos momentos, sempre dispostos a me apoiar com palavras de incentivo e a oferecer o colo quando as coisas ficavam difíceis. Saber que posso contar com vocês é um presente valioso que agradeço todos os dias.

Ao meu marido, Leonardo, meu agradecimento mais profundo. Sua paciência e apoio incondicional foram fundamentais para que eu pudesse seguir em frente com meus estudos e alcançar este resultado. Nos momentos em que me senti cansada ou desmotivada, foi o seu amor, sua compreensão e sua confiança em mim que me deram forças para continuar. Você esteve ao meu lado em cada momento desta trajetória, e sou eternamente grata por isso.

À minha orientadora, Profa Dra Tatiana Barichello, agradeço do fundo do coração por ter me aceito como sua orientanda. Sua sabedoria, paciência e incentivo foram fundamentais para que este trabalho pudesse se concretizar. Obrigada por acreditar no meu potencial, por suas valiosas contribuições e por sempre me impulsionar a buscar mais conhecimento. Aprendi muito durante esses quatro anos e levarei esse aprendizado comigo para sempre.

À minha co-orientadora, Profa Dra. Jaqueline da Silva Generoso, minha sincera gratidão pelo apoio e pelas importantes contribuições ao longo deste percurso. Sua disponibilidade, atenção aos detalhes e dedicação foram essenciais

para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço imensamente por me ajudar a superar os desafios e por compartilhar comigo seu conhecimento e experiência.

Aos meus colegas de laboratório, sou profundamente grata pela parceria, pelo companheirismo e pela troca de conhecimentos ao longo desta jornada.

Aos meus amigos, por me sustentarem emocionalmente nos momentos mais difíceis e celebrarem comigo cada pequena vitória ao longo desta jornada.

A todos vocês, meu mais sincero e profundo agradecimento. Esta conquista é, em grande parte, fruto do apoio, incentivo e carinho que recebi de cada um ao longo desta jornada.

*“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”*  
Cora Coralina

## 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. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a periodontite apical induzida e contaminada com *E. faecalis* pode causar inflamação sistêmica, alterações intestinais e cognitivas em modelo experimental de PA. Foram utilizados 80 ratos Wistar machos adultos (60 dias, 250-300 g), onde foi induzida a PA. Foram divididos em grupo controle/salina (n=20); controle/*E. faecalis* (n=20); PA/salina (n=20); PA/*E. faecalis* (n=20). No grupo PA/salina 10 µL de solução salina foram colocados no interior do canal e selado a cavidade de acesso com cimento de ionômero de vidro e no grupo e PA/ *E. faecalis* 10 µl de solução bacteriana de *E. faecalis* foi colocado no interior do canal e selado a cavidade de acesso com cimento de ionômero de vidro. No grupo controle/ *E. faecalis* não foi realizado acesso endodôntico e os animais receberam 10 µl de suspensão bacteriana em swab aplicado diretamente na cavidade oral do animal e o grupo controle/salina recebeu 10 µl de suspensão salina em swab aplicado diretamente na cavidade oral. Após o experimento os animais retornaram para o biotério em suas caixas moradias. No 10º dia após a indução da lesão, foram realizados os testes comportamentais de habituação ao campo aberto e esquivas inibitórias, além da tomografia computadorizada de mandíbula. No 21º dia foi realizado novamente os testes comportamentais e tomografia computadorizada e após a eutanásia, foi realizada coleta de amostras do íleo, baço, timo, coração e soro para análises imunológicas e histológicas. Em 10 dias os animais dos grupos PA/salina, controle/*E. faecalis* e PA/*E. faecalis* apresentaram dano de memória, entretanto aos 21 dias somente o grupo PA/ *E. faecalis* manteve o dano de memória de longo prazo e aversiva quando comparados aos controles. Com relação aos parâmetros inflamatórios, verificou-se que os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 e parâmetros oxidativos estiveram exacerbados em praticamente todos os grupos, com exceção do grupo controle/ salina, no soro e estruturas periféricas baço, timo e coração. Além disso, o grupo PA/ *E. faecalis* demonstrou diferença de seus níveis de citocinas comparado ao grupo controle/salina e ao grupo PA/salina em praticamente todas as estruturas avaliadas. Na avaliação do íleo verificou-se ainda que o comprimento das vilosidades e das criptas foi reduzido nos grupos PA/ salina e PA/ *E. faecalis* em comparação com seus grupos controle, com piora expressiva no grupo PA/ *E. faecalis* quando comparado a PA/ salina. Com estes resultados verificou-se que o processo infeccioso por *E. faecalis* exacerba parâmetros inflamatórios e oxidativos em modelo animal de PA, resultando em espécies reativas de oxigênio (EROs) circulantes na periferia, danos em órgãos secundários e aumento da permeabilidade intestinal. Além disso, o processo infeccioso correlacionou-se a dano de memória nos grupos lesionados.

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

## 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. The objective of this study was to evaluate whether apical periodontitis caused and contaminated with *E. faecalis* can cause systemic inflammation, alterations in intestinal homeostasis and cognitive alterations in the experimental model of AP. One hundred adult male Wistar rats (60 days, 250-300 g) were used, where AP was provoked. They were divided into control/saline group (n=25); control/*E. faecalis* (n=25); AP/saline (n=25); AP/*E. faecalis* (n=25). In the PA/saline group, 10  $\mu$ L of saline solution was placed inside the canal and the access cavity was sealed with glass ionomer cement, and in the PA/*E. faecalis* group, 10  $\mu$ L of *E. faecalis* bacterial solution was placed inside the canal and the access cavity was sealed with glass ionomer cement. In the control/*E. faecalis* group, no endodontic access was performed and the animals received 10  $\mu$ L of bacterial suspension in a swab applied directly to the animal's oral cavity, and the control/saline group received 10  $\mu$ L of saline suspension in a swab applied directly to the oral cavity. After the experiment, the animals were returned to the vivarium in their housing boxes. On the 10th day after injury induction, behavioral tests of habituation to the open field and inhibitory avoidance were performed, in addition to computed tomography of the jaw. On the 21st day, behavioral tests were performed again and after euthanasia, samples of ileum, spleen, thymus, heart and serum were collected for immunochemical and immunohistochemical analyses. Within 10 days, the animals in the PA, control/ *E. faecalis* and PA/ *E. faecalis* groups showed memory impairment, however, at 21 days only the PA/ *E. faecalis* group maintained the long-term and aversive memory impairment when compared to the controls. Regarding inflammatory settings, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 and oxidative disruptions were exacerbated in practically all groups, except for the control/saline group, in the serum and peripheral structures spleen, thymus and heart. Furthermore, the PA/ *E. faecalis* group demonstrated a difference in their levels compared to the control/saline group and the PA/saline group in practically all structures evaluated. In the evaluation of the ileum, it was also provided that the length of the villi and crypts was reduced in the PA/saline and PA/ *E. faecalis* groups compared to their control groups, with significant worsening in the PA/ *E. faecalis* group when compared to PA/saline. These results showed that the infectious process by *E. faecalis* exacerbates inflammatory and oxidative disruptions in the animal model of AP, resulting in circulating reactive oxygen species (ROS) in the peripheral circulation, secondary organ damage and increased intestinal permeability. In addition, the infectious process correlated with long-term and aversive brain memory impairment in injured groups.

**Keywords:** Apical periodontitis, *Enterococcus faecalis*, cognitive impairment, inflammation, neurodegeneration.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fases da formação do biofilme. ....	18
Figura 2: Desenho esquemático da evolução da doença cárie. ....	23
Figura 3: Representação do protocolo experimental. ....	35
Figura 4: Distribuição dos animais para as técnicas experimentais. ....	35
Figura 5: Imagem esquemática representando o acesso a câmara pulpar para a indução da PA. ....	37
Figura 6: Aparato para a avaliação do teste comportamental de campo aberto. ....	39
Figura 7: Aparato para avaliação do teste de esquiva inibitória. ....	40
Figura 8: Imagem de TCFC do modelo animal com 10 dias após indução da PA ....	44
Figura 9: Imagem de TCFC do modelo animal número 21 dias após indução da PA .....	45
Figura 10: Teste de habituação a campo aberto em ratos Wistar adultos 10 dias após indução de PA. ....	46
Figura 11: Teste de esquiva inibitória em 10 (11A) e 21 dias (11B) após a indução da PA .....	47
Figura 12. Níveis de TNF- $\alpha$ .....	48
Figura 13. Níveis de IL-1 $\beta$ .....	49
Figura 14. Níveis de IL-6. ....	49
Figura 15. Níveis de IL-10 .....	50
Figura 16. Níveis de produção de EROs por DCF-DA .....	51
Figura 17. Níveis de carbonilação de proteínas .....	51
Figura 18. Níveis de peroxidação lipídica .....	52
Figura 19. Atividade da SOD .....	52
Figura 20. Atividade de CAT .....	53
Figura 21. Análise do baço .....	54
Figura 22. Análise do Íleo .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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*);

GSH - Glutathiona;

IL – Interleucina;

LTA - Ácido lipoteicóico (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*);

SOD - Superóxido dismutase;

SPE - Substâncias poliméricas extracelulares;

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
1.1. PERIDONTITE APICAL.....	16
1.2. EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.3. DIVERSIDADE MICROBIANA EM BIOFILMES ENDODÔNTICOS.....	18
1.3.1. <i>Enterococcus Faecalis</i> .....	21
1.4. FISIOPATOLOGIA DA PA.....	22
1.5. INFLAMAÇÃO.....	23
1.6. ESTRESSE OXIDATIVO.....	26
1.7. TRATAMENTO DA PA.....	28
1.8. DANO COGNITIVO E ALTERAÇÕES SISTÊMICAS.....	29
1.9. JUSTIFICATIVA.....	30
2. OBJETIVOS.....	32
2.1. OBJETIVO GERAL.....	32
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. TIPO DE ESTUDO.....	33
3.2. LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	33
3.3. ANIMAIS.....	33
3.4. DESENHO EXPERIMENTAL.....	34
3.5. PREPARAÇÃO DO MICRORGANISMO INFECTANTE.....	35
3.6. MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DE PA.....	36
3.7. TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DE FEIXE CÔNICO.....	37
3.8. TESTES COMPORTAMENTAIS.....	38
3.8.1. Habituação de campo aberto.....	38
3.8.2. Esquiva inibitória.....	39
3.9. ANÁLISES NEUROQUÍMICAS.....	40
3.9.1. Níveis de citocinas.....	40
3.9.2. Avaliação de defesa enzimática e dano oxidativo.....	40
3.10. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	42
3.11. DESCARTE DOS MODELOS ANIMAIS.....	42
3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4. RESULTADOS.....	44

4.1. TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DE FEIXE CÔNICO (TCFC) EM 10 E 21 DIAS APÓS INDUÇÃO DO MODELO EXPERIMENTAL .....	44
4.2. TESTES COMPORTAMENTAIS .....	45
4.3. CITOCINAS .....	48
4.3.1. TNF- $\alpha$ .....	48
4.3.2. IL 1 $\beta$ .....	48
4.3.3. IL-6.....	49
4.3.4. IL-10.....	50
4.4. Dano oxidativo .....	50
4.5. Estruturas.....	53
4.5.1. Baço.....	53
4.5.2. Íleo.....	55
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÃO .....	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXOS .....	80
ANEXO A – Certificado de aprovação CEUA.....	82
ANEXO B – Certificado de aprovação CEUA.....	83

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. PERIODONTITE APICAL

A periodontite apical (PA) é um processo inflamatório crônico ou agudo dos tecidos perirradiculares em resposta a uma infecção endodôntica, culminando com a destruição das estruturas ósseas do periodonto devido à interação entre fatores microbianos, como bactérias e toxinas presentes no interior do canal radicular, e a resposta imune do hospedeiro (Conti, Segura-Egea, Cardoso *et al.* 2020, Felipe Pereira, Willian Lattari Tessarin, Yamamoto Chiba *et al.* 2021, Naruse, Itoh, Itoh *et al.* 2021). Enquanto as infecções agudas são causadas por bactérias altamente virulentas ou pelo efeito sinérgico de múltiplas espécies, a PA crônica está associada a bactérias menos virulentas (Ferreira, Pereira, Souza-Monteiro *et al.* 2024).

As patologias pulpares e perirradiculares podem ser de natureza inflamatória ou microbiana, e são geralmente hipóxias devido aos danos vasculares, metabolismo das bactérias e resposta celular mediada pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Tang, Zhou, Gao *et al.* 2014, Park, Kim, So *et al.* 2021). A contaminação do tecido pulpar pode ser em decorrência da doença cárie, fissuras em restauração ou em dentes, trauma e através do periodonto que induzirá uma resposta inflamatória. Esta por sua vez, se não tratada, levará a necrose pulpar e consequente contaminação do sistema de canais radiculares, túbulos dentinários e infecção do periodonto apical (Azuma, Cardoso, Samuel *et al.* 2021).

Outros fatores de risco para PA foram identificados, sendo que a higiene bucal, nutrição, fatores sociais, educacionais e econômicos são os que possuem as maiores evidências (Baima, Shin, Arrica *et al.* 2023). Diante dessa complexa interação de fatores, a epidemiologia da PA é um campo essencial para compreender a prevalência e os fatores de risco associados a essa condição em diferentes populações.

### 1.2. EPIDEMIOLOGIA

A PA é, em muitos casos, uma consequência direta das cáries dentais, que afetam aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas globalmente (Jakovljevic, Nikolic, Jacimovic *et al.* 2020). De fato, a cárie não tratada pode levar à necrose

pulpar e posterior infecção do tecido periapical, criando um ambiente propício para o desenvolvimento de PA (Li, Xiang, Ren *et al.* 2024). Esse fenômeno é refletido em uma revisão sistemática e metanálise que envolveu 34.668 indivíduos de diferentes países, na qual foi observada uma prevalência de PA em 52% dos participantes, com cada um apresentando pelo menos um dente acometido. A prevalência foi significativamente maior em países em desenvolvimento (53%) e em transição (80%) em comparação com os países desenvolvidos (51%), sendo que 24% a 65% dos casos podem ser detectados radiograficamente (Tibúrcio-Machado, Michelon, Zanatta *et al.* 2021).

Na cavidade oral, a cárie, a gengivite e a periodontite marginal são exemplos típicos de doenças causadas por biofilmes bacterianos e evidências tendem a incluir a PA neste conjunto de doenças bucais induzidas por biofilme (Georgiou, Crielaard, Armenis *et al.* 2019, Conti, Segura-Egea, Cardoso *et al.* 2020, Naruse, Itoh, Itoh *et al.* 2021). Aproximadamente 34% das PA estão associadas às cáries profundas, indicando uma relação limítrofe entre bactérias, cárie dental e lesões periapicais (Georgiou, Crielaard, Armenis *et al.* 2019).

No Brasil, os dados sobre a prevalência de PA são limitados e difíceis de generalizar devido ao pequeno tamanho das amostras nas pesquisas existentes. Um estudo realizado na Universidade do Rio de Janeiro encontrou uma prevalência de 7,87% de PA nas amostras analisadas, de um total de 15.724 radiografias analisadas, mas os próprios autores alertam que a baixa abrangência populacional limita a aplicabilidade dos dados a nível nacional (Berlinck, Tinoco, Carvalho *et al.* 2015). Essa lacuna de conhecimento reforça a importância de estudos epidemiológicos mais amplos para uma compreensão mais precisa da PA no Brasil e em outras regiões.

Paralelamente, a microbiologia tem evidenciado o papel central dos biofilmes microbianos na etiologia da PA e em várias outras doenças infecciosas. Estima-se que os biofilmes sejam responsáveis por cerca de 65-80% das infecções humanas no mundo (Barcelos, Rosa, Roversi *et al.* 2020, Tibúrcio-Machado, Michelon, Zanatta *et al.* 2021), sendo um mecanismo central no desenvolvimento tanto da cárie quanto da PA (Ricucci, Siqueira 2010, Zhang, Yang, Hou 2021). Assim, a compreensão do comportamento desses biofilmes é crucial para o manejo eficaz das infecções periapicais.

### 1.3. DIVERSIDADE MICROBIANA EM BIOFILMES ENDODÔNTICOS

O biofilme bacteriano pode ser definido como um filme multicelular sésil, no qual as células individuais crescem e se agregam para formar micro colônias ordenadas na matriz de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), um composto de biopolímeros hidratados formados por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios secretados pelas células do biofilme conferindo características essenciais para a fisiologia, produção e existência do biofilme, podendo exibir 300 ou mais camadas de células de espessura (figura 1) (Siqueira, Rôças, Ricucci 2010, Tennert, Fuhrmann, Wittmer *et al.* 2014, Galler, Weber, Korkmaz *et al.* 2021).

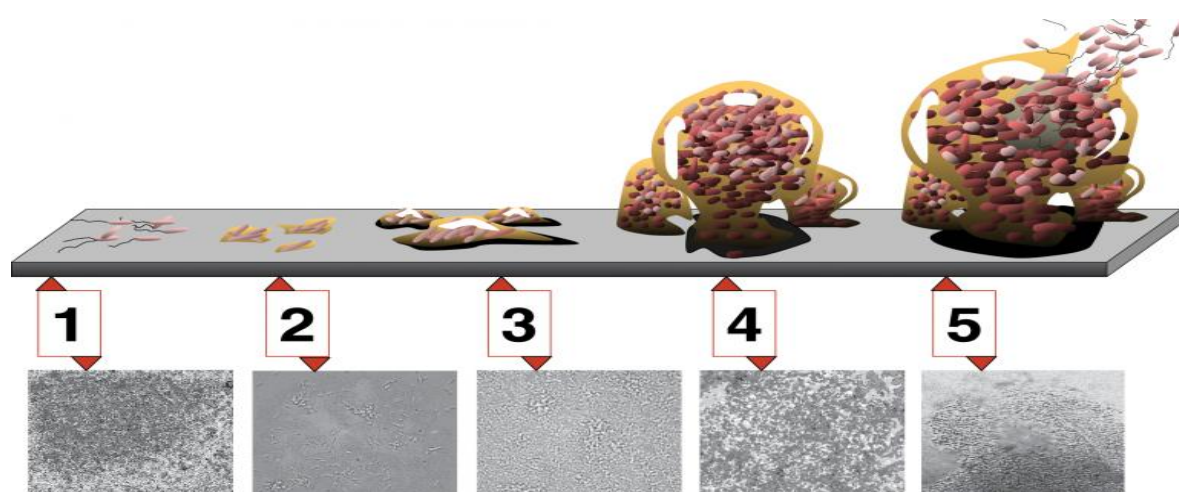


Figura 1: Fases da formação do biofilme. 1: fixação de bactérias, 2 e 3: formação de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), 4: maturação, 5: biofilme maduro. Figura/ilustração elaborada pelo auto. Adaptado de (Monroe 2007).

A princípio, pode-se pensar que para ocorrer a formação de biofilme a polpa teria que se tornar necrótica e liquefeita antes da invasão bacteriana. No entanto, se considerar a dinâmica de invasão do canal radicular por bactérias presentes nas lesões de cárie que expuseram o tecido pulpar, pode-se vislumbrar uma dinâmica diferente para a formação de biofilme, o que é sustentado por observações histobacteriológicas (Galler, Weber, Korkmaz *et al.* 2021).

A cárie é uma doença resultante da formação de biofilmes compostos inicialmente por colônias bacterianas Gram-positivas, que em estágios avançados passam a incluir bactérias Gram-negativas em áreas do tecido hospedeiro associadas a células inflamatórias. O desenvolvimento dessa condição depende do desequilíbrio do microbioma oral, que é formado por uma variedade de

microrganismos, como bactérias, fungos e vírus (Jiang, Deng, Dai *et al.* 2021, Li, Liu, Yang *et al.* 2022). Como resultado da exposição, a porção pulpar abaixo da lesão cariosa, torna-se severamente inflamada e necrótica destruindo a camada de odontoblastos e os fibroblastos pulpares adjacentes são ativados participando da resposta inume do hospedeiro. À medida que a infecção avança envolve primeiro o tecido na câmara pulpar e se move para dentro da polpa em direção apical, ocasionando a necrose e infecção do canal radicular (Poornima, Ravishankar, Abbott *et al.* 2021, Segura-Egea, Cabanillas-Balsera, Martín-González *et al.* 2023).

O biofilme presente nos terços iniciais dos canais radiculares é constituído predominantemente por bactérias associadas à cárie (Gram-positivas). Contudo, após a invasão do sistema de canais pelos túbulos dentinários, a composição desse biofilme sofre alterações, passando a ser dominada por bastonetes anaeróbios Gram-negativos e bactérias proteolíticas. A flora intracanal madura é composta por cocos, bastonetes, organismos filamentosos e espiroquetas, que se agrupam nas paredes dentinárias do canal radicular (Rodrigues, de Andrade, de Vasconcelos *et al.* 2018). Os biofilmes intrarradiculares, observados nas PAs, podem ser encontrados no ápice dos canais radiculares, em ramificações, istmos, nas paredes dentinárias e na superfície externa da raiz. Esses biofilmes aderem ao colágeno não mineralizado presente na superfície dos túbulos dentinários, formando uma estrutura resistente capaz de persistir mesmo após o tratamento endodôntico (Li, Wang, Bao *et al.* 2023).

O processo de formação do biofilme ocorre gradualmente na parede dentinária do canal, ramificações apicais, canais laterais e istmos conectando os canais radiculares. À medida que a infecção se move apicalmente, e conforme o processo avança, essas bactérias recebem “reforços” de novas bactérias da saliva e tornam-se cada vez mais organizadas e atingem um estado de homeostase comunitária e equilíbrio (Ricucci, Siqueira, Abdelsayed *et al.* 2021).

Esse processo é crucial para a patogênese da PA, cuja etiologia infecciosa foi bem documentada e estudos contribuíram para definir as espécies microbianas associadas à doença (Ricucci, Siqueira 2010). Estudos demonstraram que a patogênese da PA requer a ação conjunta de bactérias em uma comunidade multiespécies cuja diversidade pode variar de acordo com o tipo de infecção e manifestação clínica da doença (Rodrigues, de Andrade, de Vasconcelos *et al.* 2018). Estudos morfológicos indicam que a microbiota endodôntica está relacionada

à presença de bactérias em dentes não tratados (infecção primária), de bactérias residuais (infecção persistente) ou reinfecção de um ambiente do canal radicular já desinfetado (infecção secundária), e demonstraram que o padrão dominante de colonização bacteriana do sistema de canais radiculares se assemelha ao dos biofilmes típicos na cavidade bucal (Siqueira, Rôças, Ricucci 2010).

O biofilme apical é responsável por liberar fatores de virulência, constituído por componentes celulares, antígenos e substâncias secretadas, que causam danos aos tecidos perirradiculares em contato direto culminando em danos e estimulando/modulando a resposta imune do hospedeiro, apresentando sintomas clínicos como dor e edema (Ricucci, Siqueira 2008, Siqueira, Rôças, Ricucci 2010). A gravidade da PA varia de acordo com a virulência do biofilme: em infecções com alta virulência, desenvolve-se uma PA aguda, enquanto infecções de baixa virulência resultam em processos crônicos, frequentemente assintomáticos (Ricucci, Siqueira 2010, Felipe Pereira, Willian Lattari Tessarin, Yamamoto Chiba *et al.* 2021). Estudos microbiológicos avançados identificaram mais de 1.000 espécies bacterianas na cavidade oral, com mais de 400 delas associadas com diferentes formas de PA (Siqueira, Rôças, Ricucci 2010).

Os gêneros mais prevalentes em infecções endodônticas primárias incluem bastonetes anaeróbios Gram-negativos, como *Prevotella sp.*, *Porphyromonas sp.*, *Tannerella forsythia* (um patógeno periodontal), *Asaccharolytic sp.*, e *Fusobacterium sp.*, além de bactérias Gram-negativas com flagelos periplasmáticos, como *Treponema sp.* (Zheng, Wu, Niu *et al.* 2019). Essas infecções também podem envolver fungos, vírus e bastonetes anaeróbios Gram-positivos, como *Parvimonas micra*, *Streptococcus sp.*, e *Enterococcus faecalis*, que podem persistir mesmo após o tratamento endodôntico. Além disso, bastonetes microaerofílicos Gram-negativos, como *Campylobacter*, têm sido associados a infecções endodônticas, abscessos periapicais e infecções extrarradiculares (Zahran, Witherden, Mannocci *et al.* 2021).

As infecções secundárias decorrem devido a reinfecção, infecção persistente ou infecção recorrente em dentes previamente submetidos a tratamento endodôntico, que se caracterizam pela presença de enterococos, estreptococos, lactobacilos, *Actinomyces*, fungos, *E. faecalis*, bacteroides e *Dialister*. Esses microrganismos foram identificados em infecções endodônticas assintomáticas associadas à PA crônica. Em contraste, anaeróbios obrigatórios como *F. nucleatum*,

*P. intermedia* e *D. pneumosintes* foram encontrados em infecções sintomáticas diagnosticadas clinicamente como abscessos agudos (Costa, Pacheco-Yanes, Siqueira *et al.* 2019, Vieira, Pérez, Alves *et al.* 2020).

### **1.3.1. *Enterococcus faecalis***

*E. faecalis* é um coco anaeróbico facultativo Gram-positivo que normalmente habita o intestino de indivíduos saudáveis além de ser encontrado em diversos nichos ecológicos, como na água, no solo, nos alimentos e em lesões de origem endodôntica (Felipe Pereira, Willian Lattari Tessarin, Yamamoto Chiba *et al.* 2021). No entanto, apesar da aparente natureza comensal ele pode se tornar um patógeno oportunista, especialmente em situações de sistema imunológico comprometido ou tratamento endodôntico inadequado (Elashiry, Bergeron, Tay 2023). De fato, é a bactéria mais comum a ser isolada em lesões persistentes de tratamentos endodônticos malsucedidos. A prevalência desta espécie microbiana em dentes tratados endodonticamente com falha foi identificado em 77% dos casos examinados, sendo responsável por 45,8% das espécies bacterianas isoladas possuindo resistência a antimicrobianos (Dupont, Friggeri, Touzeau *et al.* 2011, Zhang, Du, Peng 2015).

A *E. faecalis* desenvolveu diversas estratégias que lhe permitem escapar da resposta imune do hospedeiro. Ele perturba as funções normais das células imunológicas, especialmente dos macrófagos, que são cruciais para orquestrar a resposta inflamatória e eliminar infecções (Chi, Lin, Meng *et al.* 2021, Song, Li, Huang *et al.* 2022). Esta perturbação dificulta a capacidade do organismo de erradicar eficazmente a infecção, contribuindo para a persistência da PA (Deng, Lin, Liu *et al.* 2023).

Associado a isso destaca-se a capacidade dessa bactéria de formar biofilmes (Boeder, Spiller, Carlstrom *et al.* 2024), resistir a antibióticos (Dupont, Friggeri, Touzeau *et al.* 2011, García-Solache, Rice 2019) e produzir vesículas extracelulares (EVs) que podem induzir respostas inflamatória (Ma, Deng, Du *et al.* 2024). Foi demonstrado que essas EVs promovem a polarização dos macrófagos em direção ao fenótipo M1, que está associado à inflamação e à destruição do tecido na área periapical (Ma, Deng, Du *et al.* 2024).

A capacidade da *E. faecalis* de sobreviver em canais radiculares após terapia endodôntica (infecção persistente) destaca a capacidade deste patógeno de suportar um pH alto e crescer na presença de medicações intracanalais a base de hidróxido de cálcio, hipoclorito de sódio, antibióticos intracanalais e sistêmicos e os protocolos de desinfecção empregados durante o tratamento de canal radicular, levando a destruição do tecido e a reabsorção óssea na região apical do elemento dental acometido (Cintra, Estrela, Azuma *et al.* 2018, Fiallos, Ribeiro Aguiar, da Silva *et al.* 2022, Segura-Egea, Cabanillas-Balsera, Martín-González *et al.* 2023).

O conhecimento dos padrões de colonização microbiana deste patógeno oportunista no local infectado é de suma importância, não apenas para uma melhor compreensão do processo da doença, mas também para o estabelecimento de estratégias terapêuticas eficazes em alcançar e eliminar o maior número possível de células bacterianas do sistema de canais radiculares (Gholizadeh, Aghazadeh, Ghotaslou *et al.* 2021, Naruse, Itoh, Itoh *et al.* 2021).

#### 1.4. FISIOPATOLOGIA DA PA

O início da PA normalmente segue-se à necrose pulpar, que pode ser desencadeada por uma lesão cáriosa profunda (Georgiou, Crielaard, Armenis *et al.* 2019). Na lesão cáriosa profunda as bactérias presentes na cavidade oral contaminam o tecido pulpar levando a necrose do tecido. Neste conjunto de circunstâncias ocorre a formação de lesões periapicais decorrentes das bactérias presentes nos sistemas de canais radiculares e células do sistema imune do hospedeiro (Georgiou, Crielaard, Armenis *et al.* 2019, Ali, Thani, Foschi *et al.* 2020).

Uma vez que a polpa está necrótica, as bactérias invadem o canal radicular, levando a uma infecção complexa caracterizada por uma microbiota mista, composta predominantemente por bactérias anaeróbicas (Gomes, Herrera 2018, Siqueira, Rôças 2022). Esta invasão microbiana resulta em uma resposta inflamatória localizada à medida que as bactérias avançam apicalmente, atingindo eventualmente os tecidos perirradiculares através dos forames apicais ou laterais podendo levar à formação de uma PA (lesão osteolítica) na região apical das raízes (figura 2) (Barcelos, Rosa, Roversi *et al.* 2020, Galler, Weber, Korkmaz *et al.* 2021, Ferreira, Pereira, Souza-Monteiro *et al.* 2024).

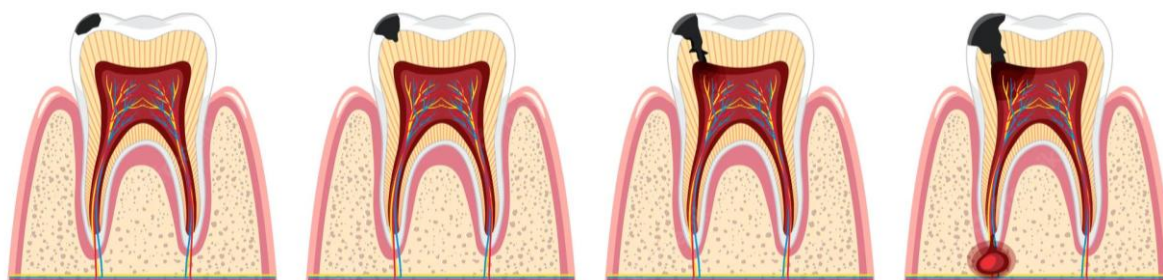


Figura 2: Desenho esquemático da evolução da doença cárie. Adaptado de (Jenkinson ,Lamont 2005).

A função da resposta inflamatória frente a processos endodônticos é conter as bactérias e seus subprodutos prevenindo a propagação da infecção, e para isso inúmeras citocinas pró-inflamatórias são produzidas *in loco* para mediar a resposta imune durante o processo inflamatório na região periapical (Cintra, Estrela, Azuma *et al.* 2018, Yang, Shen, Zhang *et al.* 2023). Embora a grande maioria das incidências aconteça em decorrência de processos crônicos, pode ocorrer a agudização exacerbando o processo infeccioso ocasionando dor e edema (Galler, Weber, Korkmaz *et al.* 2021).

A *E. faecalis* expressa algumas substâncias de agregação, como genes (agg e asa1), relacionadas a facilitação da adesão, invasão das células, troca de plasmídeos e formação do biofilme (Ben Braïek ,Smaoui 2019). A formação de biofilme, juntamente com a expressão da substância de agregação como substratos sortase, conjunto de enzimas responsável pela ancoragem de proteínas de superfície (Nielsen, Flores-Mireles, Kau *et al.* 2013), pode promover a sobrevivência de *E. faecalis* em macrófagos e neutrófilos contribuindo para a manutenção da infecção e inflamação (Chong, Tay, Janela *et al.* 2017). Além disso a *E. faecalis* produz a enzima gelatinase, uma metaloproteinase de matriz que hidrolisa várias proteínas, incluindo colágeno, hemoglobina, caseína e fibrinogênio, crucial para a adesão do patógeno à dentina e para a disseminação e aumento da inflamação em tecidos periapicais devido a degradação do colágeno por gelatinase (Guneser ,Eldeniz 2016). Essa importância se dá uma vez que o colágeno tipo I constitui até 90% das proteínas da dentina intertubular (Elashiry, Bergeron ,Tay 2023).

## 1.5. INFLAMAÇÃO

Inicialmente, a presença de biofilmes bacterianos no sistema de canais

radiculares ativa os sistemas imunológicos inato e adaptativo, levando ao recrutamento de células imunes para a região periapical com o objetivo de eliminar os patógenos (Wen, Lin, Zhou *et al.* 2024). Para mediar essa resposta, várias citocinas pró-inflamatórias são produzidas localmente durante o processo inflamatório (Cintra, Estrela, Azuma *et al.* 2018, Yang, Shen, Zhang *et al.* 2023). O equilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é crucial na determinação da progressão da lesão (Dessaune Neto, Porpino, Antunes *et al.* 2018, Wen, Lin, Zhou *et al.* 2024). Quando a infecção é contida, células T reguladoras (Tregs) e macrófagos M2 (anti-inflamatórios) liberam mediadores como interleucina (IL)-4, IL-10 e o fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), promovendo a reparação tecidual (Weber, Schlittenbauer, Moebius *et al.* 2018, Zhang, Guo, Jia 2021).

Em processos inflamatórios crônicos nos tecidos perirradiculares, há um aumento na atividade osteoclástica e uma inibição na osteoblástica. Isso resulta em uma resposta imune prolongada que reduz a capacidade de neoformação óssea, levando a uma reabsorção óssea local progressiva e, potencialmente, à perda total do suporte ósseo e consequente perda dentária (Cintra, Estrela, Azuma *et al.* 2018, Omi, Mishina 2022, Yang, Shen, Zhang *et al.* 2023).

Na inflamação apical, os macrófagos residentes são as primeiras células a entrar em contato com os patógenos, iniciando o recrutamento da resposta imune adaptativa. Os receptores *Toll-like* (TLRs) desempenham um papel fundamental nesse processo, detectando padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) nas células do sistema imunológico inato (Fernández, Cárdenas, Astorga *et al.* 2019). Além disso, os TLRs são essenciais para a secreção de mediadores pró-inflamatórios, produção de EROS e angiogênese (Fujihara, Muroi, Tanamoto *et al.* 2003, Hernández-Ríos, Pussinen, Vernal *et al.* 2017, Fernández, Herrera, Hoare *et al.* 2023).

O problema das PA causadas por *E. faecalis*, é que essa bactéria pode induzir a polarização dos macrófagos afetando sua osteoclastogênese além de ativar respostas imunes, promovendo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Song, Li, Huang *et al.* 2022). Com isso a *E. faecalis* suprime a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e a produção de citocinas pró-inflamatórias no sangue, IL-1 $\beta$ , IL-17 e interferon- $\gamma$ , em macrófagos infectados que contribui para sua sobrevivência e resistência à erradicação devido ao efeito imunossupressor. Além

disso, *E. faecalis* induz necroptose em macrófagos, um tipo de morte celular associada à patogênese e ao dano tecidual, contribuindo para o desenvolvimento de PA persistente (Segura-Egea, Cabanillas-Balsera, Martín-González *et al.* 2023).

Outro efeito da bactéria sobre os macrófagos é sua capacidade de escapar da imuno vigilância, podendo sobreviver e até se replicar dentro de macrófagos, através da inibição da apoptose (bloqueando caspase3, proteína quinase serina/treonina e fosfatidilinositol 3-quinase) e autofagia (inibição da expressão de LC3-II), processos essenciais para a homeostase tecidual e a eliminação de patógenos (Dupont, Friggeri, Touzeau *et al.* 2011, Zhang, Du, Peng 2015).

A IL-1 $\beta$ , produzida pelos inflamassomas, desempenha um papel crucial na defesa do hospedeiro contra patógeno, mas quando em quantidades muito elevadas pode amplificar a resposta inflamatória e causar danos aos tecidos (Ran, Huang, Liu *et al.* 2021). Os inflamassomas canônicos, especialmente o NLRP3 (Lu, Song, Yue *et al.* 2017), também são ativados em resposta a PAMPs e DAMPs, formando um complexo proteico que recruta a caspase-1 e promove sua ativação autoproteolítica. Isso leva à produção das formas maduras de IL-1 $\beta$  e IL-18 e desencadeia uma forma lítica de morte celular chamada piroptose (Li, Ling, Jiang 2021, Ran, Huang, Liu *et al.* 2021). A *E. faecalis* pode ativar o NLRP3 pelo reconhecimento do ácido lipoteicóico (LTA) de sua membrana pelo TLR2 na superfície de macrófagos (Deng, Lin, Liu *et al.* 2023), provocando um excesso de produção de IL-1 $\beta$  com consequente piroptose dos macrófagos (Ran, Huang, Liu *et al.* 2021, Song, Li, Huang *et al.* 2022).

O inflamassoma NLRP3 também influencia o aumento da expressão de linfócitos Th17, que secretam IL-17, e a redução dos linfócitos Treg, agravando a inflamação e a reabsorção óssea (Leng, Xu, Wu *et al.* 2023). A perda óssea ocorre de diversas maneiras, como pelo aumento da atividade osteoclástica, redução da liberação de osteoprotegerina (OPG), elevação dos níveis de RANKL e aumento da capacidade de reabsorção óssea dos osteoclastos por meio da expressão de catepsina K e metaloproteinasas (MMPs). Esses efeitos estão associados ao aumento dos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-18 que, como mencionados, estão aumentados pelo estímulo do *E. faecalis* no inflamassoma NLRP3 (Li, Ling, Jiang 2021, Ran, Huang, Liu *et al.* 2021).

Após a ativação da resposta do hospedeiro pelo biofilme patogênico, os

neutrófilos tornam-se as células inflamatórias predominantes, sendo considerados a principal fonte de EROs na periodontite (Wang, Andrukhov, Rausch-Fan 2017). A própria *E. faecalis* pode também induzir ao estresse oxidativo com a superprodução do superóxido extracelular, perturbando a função fisiológica e danificando biomoléculas e células do organismo (Boeder, Spiller, Carlstrom *et al.* 2024).

## 1.6. ESTRESSE OXIDATIVO

Estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de radicais livres (moléculas instáveis que podem danificar as células) e a capacidade do corpo de neutralizá-los com antioxidantes. Esse desequilíbrio pode levar a danos nas células, proteínas e DNA, contribuindo para o envelhecimento e diversas doenças, como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Valko, Leibfritz, Moncol *et al.* 2007, Siqueira, Rôças 2009).

As EROs são moléculas químicas que contêm oxigênio e são altamente reativas devido à presença de elétrons desemparelhados. Entre as EROs mais comuns estão o radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Siqueira, Rôças 2009). Essas moléculas desempenham um papel duplo no organismo. Em concentrações controladas, elas participam de processos fisiológicos normais, como a sinalização celular e a defesa contra patógenos. No entanto, quando produzidas em excesso, podem causar danos a proteínas, lipídios e DNA, contribuindo para o estresse oxidativo e diversas doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Mittal, Siddiqui, Tran *et al.* 2014),

O estresse oxidativo e as EROs desempenham papéis cruciais na fisiopatologia das lesões periapicais (Silva, Sousa, Lara *et al.* 2011). As EROs, incluindo o  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o  $\bullet\text{OH}$ , são moléculas altamente reativas que podem danificar diversos componentes celulares. Durante uma infecção, células do sistema imunológico, como neutrófilos e macrófagos, produzem EROs como parte da resposta de defesa contra patógenos. Contudo, em casos de inflamação crônica, frequentemente resultantes de infecções bacterianas, como nas PA, a produção contínua de EROs pode contribuir para o dano tecidual progressivo. A presença de microrganismos patogênicos na polpa dental provoca uma resposta imune que inclui a produção de EROs. Essas espécies reativas participam tanto da defesa contra patógenos quanto da mediação da inflamação e destruição tecidual (Siqueira, Rôças

2009, Silva, Sousa, Lara *et al.* 2011).

Nas patologias de origem bacteriana que levam à reabsorção óssea, como a PA, as EROs constituem um dos mecanismos patogênicos mais eficazes (Saragoça *et al.*, 2006). No entanto, pouco se sabe sobre o impacto sistêmico da PA no estresse oxidativo (Georgiou, Crielaard, Armenis *et al.* 2019). O acúmulo de EROs nas lesões periapicais resulta em danos celulares através de vários mecanismos, incluindo a peroxidação lipídica que danifica as membranas celulares, aumentando a permeabilidade e levando à morte celular; a oxidação de proteínas que afeta a função enzimática e estrutural das proteínas; e o dano ao DNA que contribui para mutações e disfunções celulares (Valko, Leibfritz, Moncol *et al.* 2007, Barcelos, Rosa, Roversi *et al.* 2020).

O organismo possui mecanismos antioxidantes, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase, que neutralizam as EROs. Em condições normais, esses sistemas mantêm um equilíbrio redox. No entanto, em lesões periapicais crônicas, a produção excessiva de EROs pode superar a capacidade antioxidante, agravando a inflamação e o dano tecidual (Valko, Leibfritz, Moncol *et al.* 2007),

Para além dos danos locais da PA o estresse oxidativo também apresenta impacto a nível sistêmico, desempenhando, por exemplo, um papel importante na patologia da aterosclerose dada à semelhança com os biomarcadores presentes em ambas as doenças (Niazi ,Bakhsh 2022). Os radicais livres podem oxidar a lipoproteína de baixa densidade (LDL) possibilitando sua interação com receptores CD36 e tipo Toll promovendo piora da resposta inflamatória na aterosclerose com mais produção de EROs (Hernández-Ríos, Pussinen, Vernal *et al.* 2017). Desse modo os processos inflamatórios crônicos têm sido considerados como potenciais preditores de aterosclerose nos últimos anos (Conti, Segura-Egea, Cardoso *et al.* 2020). Por isso a PA também pode ser considerada como um risco potencial para doenças sistêmicas, como diabetes, doença hepática, doenças cardiovasculares e doenças hereditárias, através da sua capacidade de potencializar os efeitos da doença periodontal no sangue, incluindo alterações no perfil lipídico e aumento do número de células inflamatórias (Sánchez-Domínguez, López-López, Jané-Salas *et al.* 2015, Conti, Segura-Egea, Cardoso *et al.* 2020, Azuma, Cardoso, Samuel *et al.* 2021).

As moléculas inflamatórias, proteína C reativa, IL-6, dimetilarginina

assimétrica e C3, produzidas em resposta a PA contribuem para a inflamação sistêmica de baixo grau uma vez que entram na corrente sanguínea sistêmica (Georgiou, Crielaard, Armenis *et al.* 2019, Poornima, Ravishankar, Abbott *et al.* 2021). Nesse contexto, uma inflamação sistêmica originada na cavidade bucal pode induzir ou exacerbar a neuroinflamação (Kantarci, Tognoni, Yaghmoor *et al.* 2020). Essas condições impactam negativamente a qualidade de vida de pacientes com doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer. Essa associação se deve ao aumento da inflamação sistêmica que acompanha o crescimento de microrganismos patogênicos relacionado a doenças crônicas bucais (Hajishengallis, Chavakis 2021).

### 1.7. TRATAMENTO DA PA

O tratamento de escolha para cessar essa infecção é a terapia endodôntica, que tem por objetivo reduzir ao máximo a carga bacteriana presente no interior dos canais radiculares. O tratamento endodôntico é constituído por várias etapas onde: 1: realizar um acesso endodôntico adequado removendo da coroa dental toda e qualquer estrutura acometida pela doença cárie e restaurações insatisfatórias, 2: adequar o dente através de restaurações quando necessário, 3: limpar a câmara pulpar e os canais radiculares através da limpeza química (soluções irrigadoras) e mecânica (modelagem dos canais radiculares com limas endodônticas), 4: medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio que ficará por no mínimo 7 dias, 5: obturação dos canais radiculares e 6: selamento definitivo do acesso endodôntico (Howait, Albassam, Yamada *et al.* 2019).

Quando o tratamento endodôntico é bem executado as bactérias que continuaram dentro dos canais radiculares se mantêm em equilíbrio e ocorre a cessação do processo infeccioso e o reparo ósseo se inicia. Isso se deve às condições de homeostase com a neoformação óssea e tecido conjuntivo por ação dos osteoblastos, osteócitos e fibroblastos, respectivamente, que induzem a resposta tecidual. Esse reparo total pode demorar de 6 meses a 2 anos para ocorrer, quando o antígeno foi neutralizado (Childs, Murthy 2017, Holland, Gomes, Cintra *et al.* 2017, Wang, Jin, Ao *et al.* 2019). Todavia quando ocorre a persistência de sintomatologia e ou a manutenção da PA ocorre o insucesso endodôntico. Nesses casos acontece alguma falha no tratamento endodôntico. Quando isso ocorre é

necessário o retratamento endodôntico para tentar manter o elemento dental em função na cavidade bucal do paciente (Wang, Jin, Ao *et al.* 2019, El Ouarti, Chala, Sakout *et al.* 2021, Tibúrcio-Machado, Michelon, Zanatta *et al.* 2021).

O tratamento endodôntico possui taxa de sucesso de 85% dos casos clínicos de PAs quando tratado adequadamente (Howait, Albassam, Yamada *et al.* 2019). Em contrapartida quando há uma falha a taxa de insucesso ocorre de 4% a 15%, que pode ser atribuída pelo fato da inflamação se manter persistente por falhas no processo endodôntico e a manutenção de bactérias em atividade no interior do canal radicular. O patógeno mais comumente encontrado é *E. faecalis* (Vieira, Pérez, Alves *et al.* 2020). Essa bactéria conta com diversos fatores de virulência, como citolisina, proteínas de adesão, gelatinase e ácido lipoteicóico (LTA). O LTA, por sua forte imunogenicidade, é o principal responsável pela inflamação periapical (Siqueira, Rôças 2022, Park, Ha, Sim *et al.* 2023).

Estudos demonstram que além das consequências locais da PA, a progressão e a exacerbação desse processo estão vinculadas a resposta imune do hospedeiro frente às bactérias e seus produtos, uma vez que a infecção local está conectada com todo sistema corpóreo através dos vasos sanguíneos (Cintra, Estrela, Azuma *et al.* 2018, Yang, Shen, Zhang *et al.* 2023).

## 1.8. DANO COGNITIVO E ALTERAÇÕES SISTEMICAS

Entre as propriedades imunomoduladoras mais pesquisadas para a *E. faecalis*, estão as relacionadas a influência no eixo intestino-cérebro e nos transtornos depressivos. O intestino hospeda o maior reservatório de microrganismos do corpo, fornecendo a principal fonte de regulação imunológica e participa na manutenção da homeostase cerebral, produzindo neurotransmissores, metabólitos e sinais nervosos que são transmitidos ao longo do eixo intestino-cérebro. A diversidade microbiana insuficiente no intestino pode levar à diminuição da eficácia imunitária, ao aumento da inflamação periférica e ao aumento da permeabilidade da barreira, o que pode perturbar a homeostase cerebral (Fox, Knorr, Haptonstall 2019, Krawczyk, Wityk, Gałęcka *et al.* 2021).

Observa-se que a mielinização inadequada no córtex pré-frontal é um dos processos responsáveis pelo desenvolvimento de comportamentos depressivos. Tanto o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) quanto o fator inibitório da

leucemia (LIF) desempenham um papel crucial na mielinização. *E. faecalis* eleva a expressão de proteína de ligação a elementos de resposta ao AMP cíclico (CREB). Como o BDNF é um gene alvo do CREB, a via Akt/CREB/BDNF induz a neuroplasticidade e a maturação dos oligodendrócitos imaturos, protegendo-os da diferenciação anormal observada em amostras de indivíduos com depressão (Takahashi, Kurokawa, Hong *et al.* 2022, Daca, Jarzembowski 2024).

Por outro lado, deve-se levar em conta que a desregulação da microflora intestinal leva ao aumento da permeabilidade das barreiras intestinais e da barreira hematoencefálica, resultando em aumento da penetração de produtos derivados do intestino grosso do sangue para o cérebro. Muitos metabólitos produzidos pela microbiota intestinal podem afetar direta ou indiretamente a função cerebral (Sochocka, Donskow-Łysoniewska, Diniz *et al.* 2019, Panthee, Paudel, Hamamoto *et al.* 2021).

Os mecanismos que ligam a doença endodôntica às doenças sistêmicas podem ser semelhantes aos hipotetizados para associações entre doença periodontal e doença coronariana, em que uma resposta inflamatória localizada decorrente da infecção bacteriana leva à liberação de citocinas na circulação sistêmica e a subsequentes efeitos vasculares deletérios (Conti, Segura-Egea, Cardoso *et al.* 2020). As ligações entre inflamação endodôntica e desfechos cardiovasculares são biologicamente plausíveis, considerando a predominância de bactérias anaeróbias Gram-negativas associadas a infecções endodônticas e o fato de níveis sistêmicos elevados de mediadores inflamatórios terem sido observados em pacientes submetidos a tratamento endodôntico (Caplan, Pankow, Cai *et al.* 2009). Ateromas calcificados da artéria carótida foram observados em estudo prévio em radiografias e tinham uma carga maior de infecção dentária crônica especificamente com defeitos ósseos periodontais mesiais e distais avançados de 4 mm (Joshiyura, Pitiphat, Hung *et al.* 2006).

## 1.9.JUSTIFICATIVA

A PA é um processo inflamatório crônico em resposta a uma infecção endodôntica, e a progressão e exacerbação da inflamação estão vinculadas a resposta imune do hospedeiro. Além disso, patologias como a PA e doenças periodontais são consideradas risco potencial para outras doenças, incluindo

diabetes, doença hepática e doenças cardiovasculares. Sendo assim, a PA e o *E. faecalis* tornaram-se alvos de estudos e discussões na comunidade científica sobre seu papel nas alterações em órgão periféricos, onde uma resposta inflamatória localizada decorrente da infecção bacteriana causa liberação de mediadores inflamatórios na circulação sistêmica e a subsequentes efeitos deletérios. No entanto, pouco se sabe sobre o assunto, sendo necessário e de grande relevância mais pesquisas na área.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da PA experimental induzida e contaminada com *E. faecalis* sobre alterações periféricas de ratos Wistar adultos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 no baço, coração, timo e soro 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 baço, coração, timo e soro de ratos Wistar adultos submetidos ao modelo experimental de PA contaminada ou não por *E. faecalis*;

- Avaliar comprimento das vilosidades e profundidade das criptas do íleo e cólon 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 dos testes de habituação ao campo aberto e esquiva inibitória 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. TIPO DE ESTUDO

Estudo experimental pré-clínico, utilizando modelo animal de PA.

#### 3.2. LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no 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 os protocolos 45/2021 e 37/2022 (Anexo A e B). Sendo assim, todos os cuidados para evitar ou minimizar o sofrimento dos animais durante os experimentos foram adotados.

#### 3.3. ANIMAIS

Para este estudo, foram utilizados 80 ratos machos da espécie *Ratus norvegicus* (Wistar), adultos com 60 dias de vida, pesando entre 250 e 300 g e que não tenham sido utilizados em pesquisas anteriores a esta, procedentes do Centro de Experimentação Animal da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Os animais foram acondicionados em caixas de no máximo cinco animais, com comida e água *ad libitum*, mantidos em ambiente com temperatura de 23 °C +/- 1 °C e umidade relativa entre 55 e 65%, num ciclo de 12 horas claro-escuro (7h às 19h).

Para a determinação do número de animais para o experimento, foi levada em consideração a utilização de um número mínimo possível de animais, a eficiência do modelo experimental e a estatística adequada para este tipo de avaliação.

### 3.4. DESENHO EXPERIMENTAL

Para a presente pesquisa os animais, ratos *Wistar* machos, foram divididos em quatro grupos experimentais: controle/salina (n = 20), controle/*E. faecalis* (n = 20), PA/salina (n = 20) e PA/ *E. faecalis* (n = 20), figura 3.

No primeiro dia experimental, os animais foram submetidos à indução da PA no primeiro molar inferior do lado direito. No grupo PA/salina (n = 20) foi colocado uma pequena esfera de algodão embebida com 10 µl de solução salina estéril no interior do canal e selado a cavidade de acesso com cimento de ionômero de vidro. No grupo PA/ *E. faecalis* (n = 20) foi colocada solução bacteriana de *E. faecalis* no interior do canal com auxílio de pequena esfera de algodão e selado a cavidade de acesso com cimento de ionômero de vidro. No grupo controle/*E. faecalis* não foi realizado acesso endodôntico e os animais receberam 10 µl de suspensão bacteriana em *swab* aplicados diretamente na cavidade oral. Enquanto o grupo controle/salina recebeu o mesmo volume de solução salina estéril em *swab* aplicados diretamente na cavidade oral.

No 10º dia após a indução da PA, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de habituação ao campo aberto e esquiva inibitória e após foram devidamente anestesiados e submetidos à tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) mandibular para avaliação da formação da PA.

No 21º dia após a indução da lesão, os animais foram novamente submetidos aos testes comportamentais, e após foram anestesiados para a TCFC para avaliação do desenvolvimento da PA. Em seguida, os animais foram eutanasiados para a coleta das estruturas baço, coração, timo e sangue (soro) para análise dos níveis de citocinas e parâmetros de estresse oxidativo e defesa enzimática, figura 4. No íleo foi analisado o comprimento das vilosidades e profundidade das criptas por histologia. O baço foi ainda avaliado quanto ao tamanho e área quadrada.

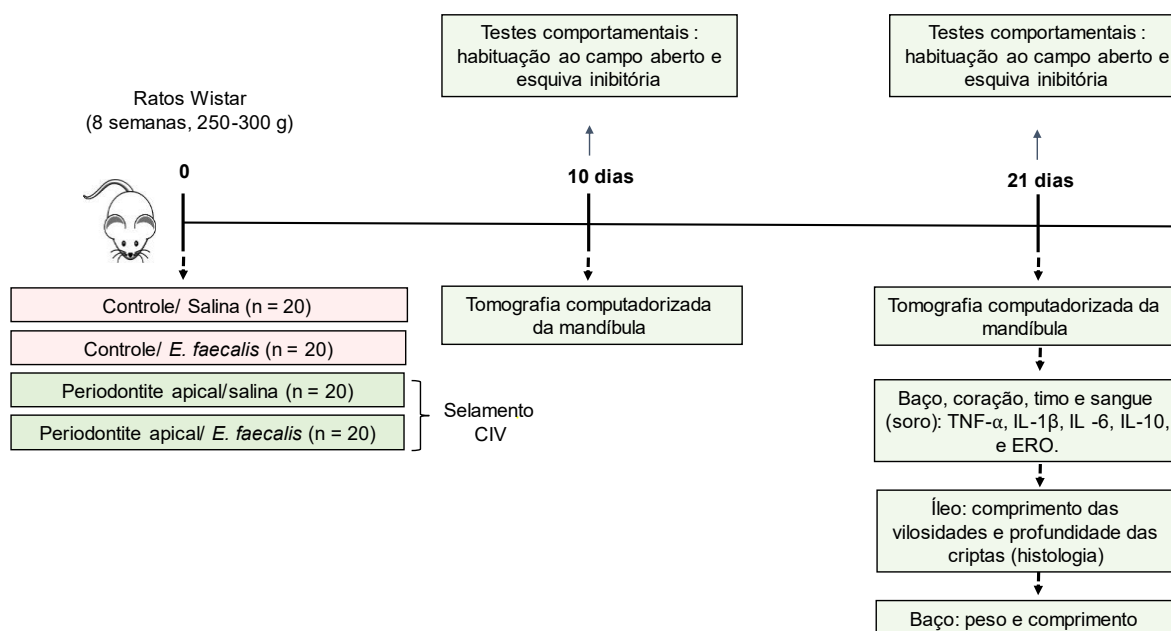


Figura 3: Representação do protocolo experimental. Figura elaborada pelo autor.

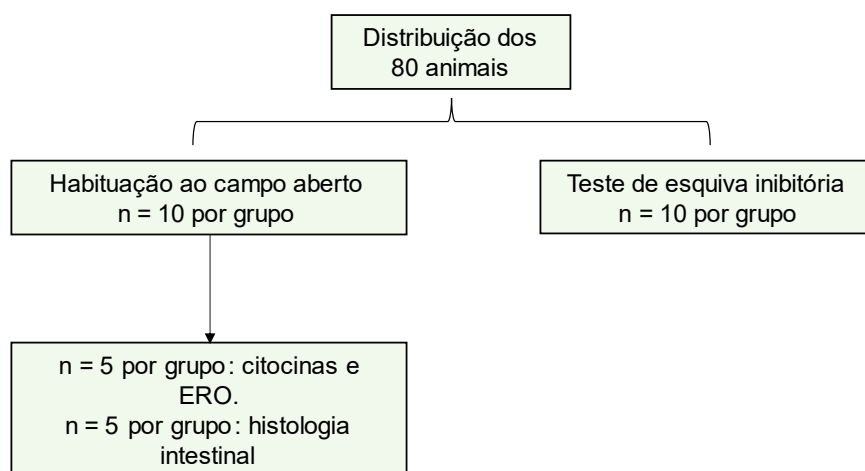


Figura 4: Distribuição dos animais para as técnicas experimentais. Figura elaborada pelo autor.

### 3.5. PREPARAÇÃO DO MICRORGANISMO INFECTANTE

A cepa de *E. faecalis*, ATCC 19433, proveniente do Fundação André Tosello, 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  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colônias por mL (UFCol/mL) (Chen, Lei, Luo *et al.* 2019).

### 3.6. MODELO EXPERIMENTAL DE INDUÇÃO DE PA

Dois grupos experimentais foram submetidos ao modelo de lesão PA: PA/salina (n = 20) e PA/ *E. faecalis* (n = 20) totalizando 40 animais. Para efetuar a indução da PA os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal (i.p.) de cloridrato de cetamina (6,6 mg/kg) (Ketamina Agener; Embu Guacu, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (0,3 mg/kg) (Dorcipec; Montes Claros, MG, Brasil) (Barichello, Netto, Ceretta *et al.* 2015).

Para realizar o acesso foi necessário estabilizar a boca do animal com amarrilha de fio dental segurando nos incisivos superiores e inferiores mantendo-a aberta para realizar o procedimento. A periapicopatia foi induzida através do acesso da câmara pulpar do dente primeiro molar inferior direito pela face oclusal com broca Carbide esférica de  $\frac{1}{2}$  com haste longa (American Burns, Palhoça, SC, Brasil) em alta rotação com irrigação (Turbina Extra Torque 505C - Kavo) e aspirando com sugadores cirúrgicos descartáveis (Sugador Flex Suctor Cirúrgico - Angelus) para a remoção do excesso de água da boca do animal (figura 5) (Scarparo, Dondoni, Böttcher *et al.* 2011, Barichello, Netto, Ceretta *et al.* 2015, Pereira, Cintra, Tessarin *et al.* 2017).

Após o acesso foi realizado a confirmação do acesso e exploração dos condutos radiculares com a utilização de um instrumento endodôntico calibre 10 (lima K Flex Maillefer - Dentsply). No grupo PA/salina foi colocado 10  $\mu$ L de solução salina no interior do canal e selado a cavidade de acesso com cimento de ionômero de vidro e no grupo e PA/ *E. faecalis* foi colocado 10  $\mu$ l de solução bacteriana de *E. faecalis* no interior do canal e selado a cavidade de acesso com cimento de ionômero de vidro. No grupo controle/*E. faecalis* não foi realizado acesso endodôntico e os animais receberam 10  $\mu$ l de suspensão bacteriana em *swab* aplicados diretamente na cavidade oral do animal e o grupo controle/salina recebeu 10  $\mu$ l de suspensão salina em *swab* aplicados diretamente na cavidade oral (Chen, Lei, Luo *et al.* 2019).

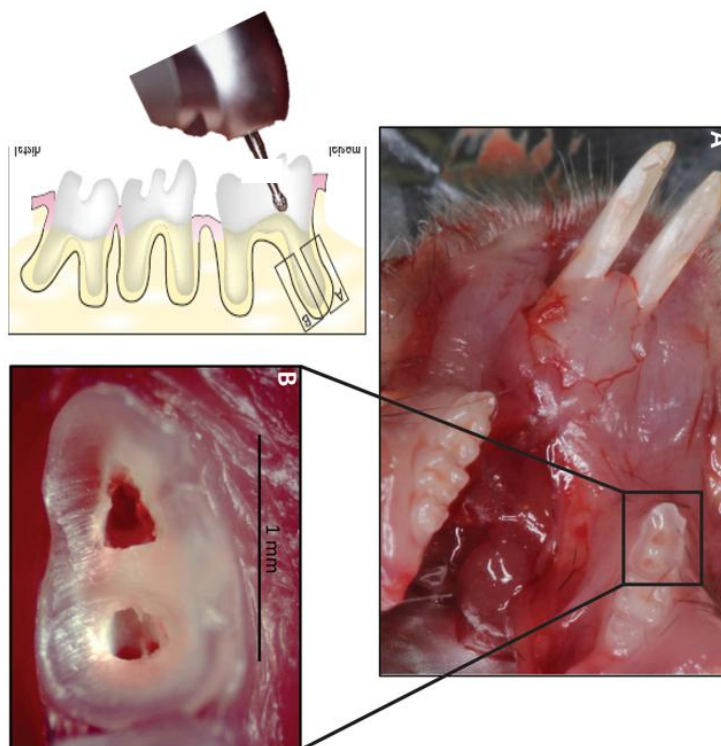


Figura 5: Imagem esquemática representando o acesso a câmara pulpar para a indução da PA. Adaptado de (Goldman, Reich, Abramovitz *et al.* 2019)

Após os procedimentos, foi realizada a reposição volêmica (50 ml/kg) com solução salina isotônica 0.9% administrada por via subcutânea e os animais 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.

### 3.7. TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA DE FEIXE CÔNICO

Após a indução da PA no 10<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia os animais foram devidamente anestesiados com cloridrato de cetamina (6,6 mg/kg) e cloridrato de xilazina (0,3 mg/kg) via intraperitoneal e foram submetidos a tomadas tomográficas da arcada dentária inferior para confirmar a presença e a extensão da PA (Chen, Lei, Luo *et al.* 2019). A TCFC foi realizada na clínica de Odontologia da UNESC, para isso os animais foram levados até a clínica de odontologia em caixa limpa e coberta com “campo estéril” e o aparelho de tomografia foi desinfetado e coberto por um “campo estéril” e barreiras para impedir a contaminação cruzada. Os padrões de aquisição de imagem foram precedidos por escanograma para garantir que o dente a ser

avaliado estivesse dentro do volume a ser adquirido, sendo o campo de visão (FOV) utilizado de 6 X 8 cm e voxel de 0,1 cm. O aparelho que foi utilizado é um tomógrafo Kavo OP 3D de origem finlandesa, operado a 4 mA a 90 kVp e tempo de 6,1 segundo de exposição. O sistema utilizado para capturar as imagens foi o *Cliniview*, onde o programa para leitura dos exames foi o *onDemand* e dos arquivos o *Dicon Vierwer (Medical Image Manipulation)*, atualizados em 2022, sendo que as mesmas 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, obtidas na espessura de 0,05 mm. Todas as imagens foram avaliadas por radiologista odontológico, sob luz ambiente reduzida e não houve tempo estimado para cada avaliação.

### 3.8. TESTES COMPORTAMENTAIS

#### 3.8.1. Habituação de campo aberto

Esse teste comportamental serviu para avaliar as atividades locomotoras e memória e foi realizado no aparato de campo aberto. O aparelho mede 40 cm x 60 cm de campo aberto cercado por 50 cm de parede feita de madeira com um vidro frontal. O piso do campo aberto é dividido em 9 retângulos por linhas pretas (figura 6). Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrante traseiro esquerdo e, em seguida, deixados sozinhos para explorar a arena por 5 min (sessão treino). Imediatamente após este procedimento, os animais foram levados novamente para a sua gaiola e 24 h depois foram submetidos a uma nova sessão no aparelho de campo aberto (sessão teste). Durante 5 min, em ambas as sessões, foram observadas e documentadas todas as vezes que o animal cruzou as linhas pretas (*crossings*) ou se apoiou com as patas traseiras levantando as dianteiras, atividade exploratória (*rearings*). A diminuição do número *crossings* e *rearings* entre as duas sessões foi tomado como uma medida da retenção de memória de habituação (Vianna, Alonso, Viola *et al.* 2000).

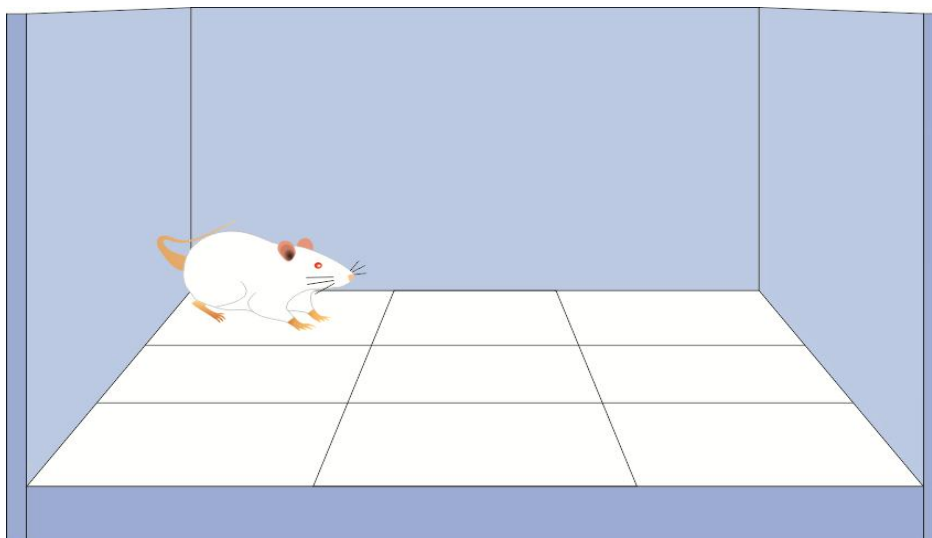


Figura 6: Aparato para a avaliação do teste comportamental de campo aberto. Figura/Ilustração elaborada por Allan Collodel, Laboratório de Fisiopatologia Experimental, 2021.

### 3.8.2. Esquiva inibitória

O teste de esquiva inibitória foi realizado em um aparato que consiste em uma caixa de acrílico medindo 50 x 25 x 25 cm (Albarsch, Porto Alegre, Brasil), cujo piso é formado por barras paralelas de aço inoxidável (diâmetro de 1 mm) espaçadas em uma distância de 1 cm (figura 7). Uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento foi colocada junto à parede esquerda do aparelho. Na sessão treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e o tempo que estes levaram para descer sobre as grades com as quatro patas foi contabilizado. Imediatamente após tocarem com as quatro patas na grade, os animais receberam um choque de 0,4 mA durante 2 segundos e voltaram à sua gaiola de origem. A sessão teste foi realizada 24 h após a sessão treino. Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e então, medido o tempo que ele levou para descer (latência), porém não foi aplicado o choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória (Izquierdo, Barros, Mello e Souza *et al.* 1998, Bevilaqua, Kerr, Medina *et al.* 2003). O teste de esquiva inibitória avalia a memória aversiva do animal. O aparato e os procedimentos têm sido descritos em estudos anteriormente publicados (Quevedo, Vianna, Zanatta *et al.* 1997, Roesler, Schröder, Vianna *et al.* 2003).

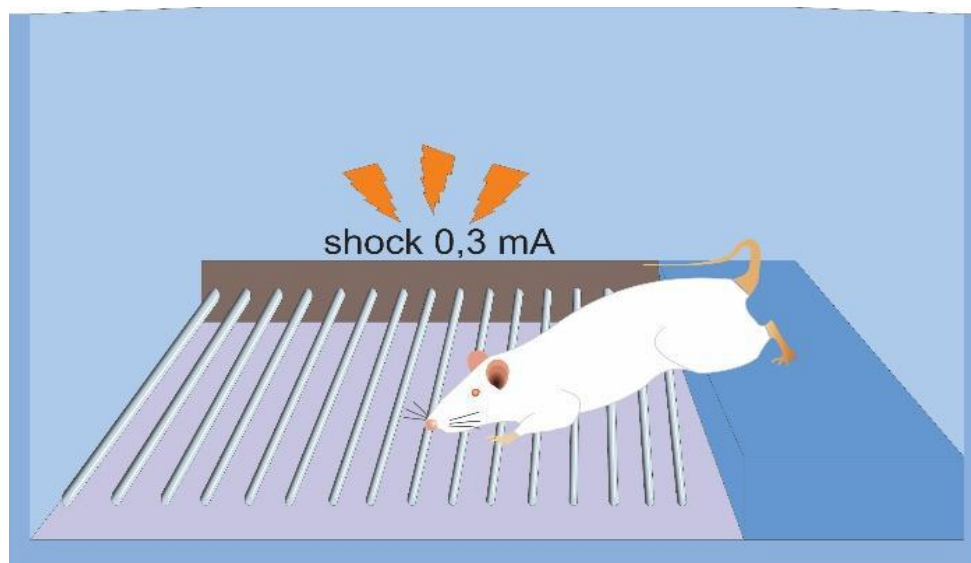


Figura 7: Aparato para avaliação do teste de esquiva inibitória. Figura/Ilustração elaborada por Allan Collodel, Laboratório de Fisiopatologia Experimental, 2021.

### 3.9. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

#### 3.9.1. Níveis de citocinas

As concentrações de citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-6 foram determinadas no soro, baço, coração e timo 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).

#### 3.9.2. Avaliação de defesa enzimática e dano oxidativo

Os parâmetros de estresse oxidativo e defesa enzimática foram avaliados nas amostras de soro, baço, coração e timo.

### 3.9.2.1. 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 absorvância em 535 nm.

### 3.9.2.2. 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 absorvância em 370 nm.

### 3.9.2.3. 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 and Bondy 1992).

### 3.9.2.4. Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorvância 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).

### 3.10. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Amostras para histopatologia foram removidas da região do íleo e colocadas em formalina tamponada neutra para fixação e cortes corados com hematoxilina-eosina de 5 microns de espessura foram preparados após inclusão em parafina e processamento histológico. Os cortes histológicos foram avaliados por microscopia de luz padrão. As medidas do comprimento das vilosidades intestinais e da profundidade das criptas foram realizadas usando o software NIS Br e foram feitas a partir de fotomicrografias tiradas com ampliação de 100x em microscópio invertido Nikon Ti-U eclipse (Nikon, Tóquio, Japão) (Giridharan, Generoso, Lence *et al.* 2022).

### 3.11. DESCARTE DOS MODELOS ANIMAIS

Após os experimentos, todos os animais foram anestesiados e decapitados por guilhotina. O descarte foi feito por acondicionamento em saco branco leitoso, identificados como “lixo infectante” e levados para um freezer de resíduos localizado no biotério da UNESC para a conservação até o momento de coleta por uma empresa terceirizada, que fez o tratamento e disposição final, conforme RDC nº 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

### 3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e para homogeneidade usando o teste de Levene. Para os dados normais e homogeneidade de variância confirmada, foram utilizados testes paramétricos; os dados que não cumprirem estas condições, foram utilizados os testes não-paramétricos. 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 habituação ao campo aberto foram relatados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e a comparações dentre os grupos foram feitas utilizando-se teste *t* de Student pareado. Dados da tarefa de esquiva inibitória foram expressos pela média  $\pm$  intervalo interquartil realizados pelo teste U-Mann-Whitney. As comparações dentro dos grupos foram realizadas pelo teste de Wilcoxon. Todas

as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 20.0, foi adotado um intervalo de confiança de 95% com nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

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

A figura 8 demonstra que em 10 dias após a indução do modelo experimental não houve a formação de lesão apical em nenhum dos grupos analisados. Entretanto, no 21º observou-se que os animais submetidos ao modelo de PA apresentaram um aumento da radiolucidez apical quando comparados aos grupos controle/salina e controle/*E. faecalis*, indicando a presença de formação de PA nestes grupos (figura 9).

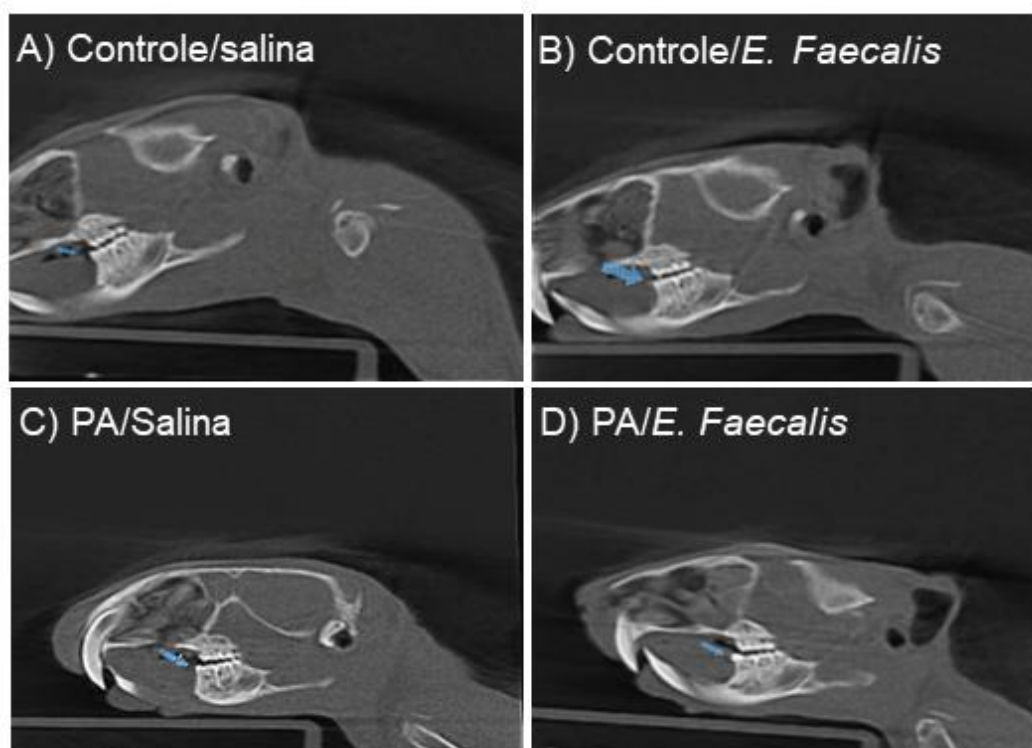


Figura 8: Imagem de TCFC do modelo animal com 10 dias após indução da PA. As imagens acima mostram os resultados obtidos das dimensões e volumes (corte sagital) dos grupos controle/ salina, controle/ *E. faecalis*, PA/ salina e PA/ *E. faecalis*. As lesões são apresentadas em milímetros (mm). Foram utilizados 6 animais por grupo. Figura/ Ilustração elaborada pelo autor.

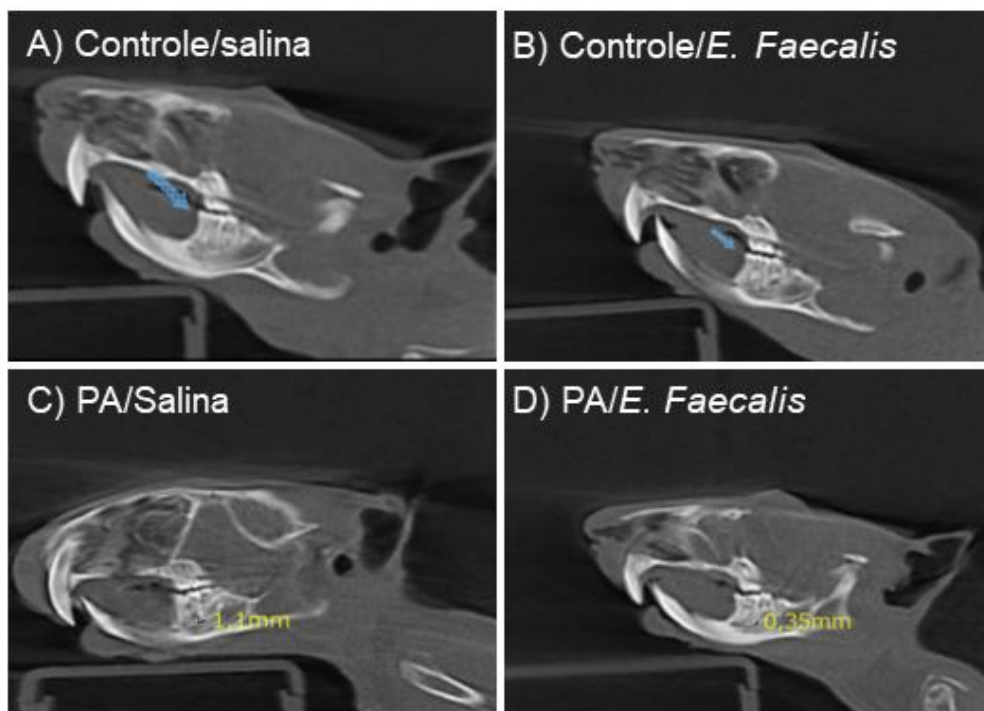


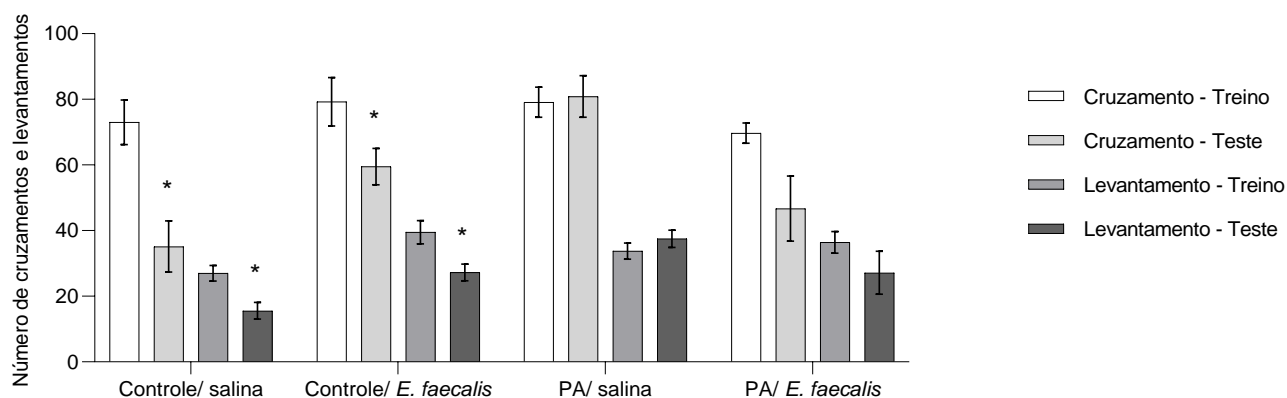
Figura 9: Imagem de TCFC do modelo animal número 21 dias após indução da PA. As imagens acima mostram os resultados obtidos das dimensões e volumes (corte sagital) dos grupos controle/ salina, controle/ *E. faecalis*, PA/ salina e PA/ *E. faecalis*. As lesões são apresentadas em milímetros (mm). Foram utilizados 6 animais por grupo. Figura/ Ilustração elaborada pelo autor.

#### 4.2. TESTES COMPORTAMENTAIS

Na figura 10A, observam-se os resultados obtidos no teste comportamental de habituação ao campo aberto 10 dias após o modelo experimental de PA. Nos grupos controle/salina e controle/*E. faecalis* houve diminuição no número de cruzamentos e levantamentos na sessão teste quando comparado a sessão treino, demonstrando preservação de memória de habituação nesses grupos ( $p < 0,05$ ). No entanto, nos grupos PA/ salina e PA/*E. faecalis*, não houve diferença estatística entre as sessões ( $p > 0,05$ ), indicando prejuízo de memória de habituação nesses animais.

Em 21 dias após a indução da PA (figura 10B), houve diferenças estatística significativa entre as sessões treino e teste em todos os grupos, com exceção do grupo PA/*E. faecalis*, que continuou apresentando prejuízo de memória de habituação, pois não apresentou diferença entre as sessões ( $p > 0,05$ ).

10A)



10B)

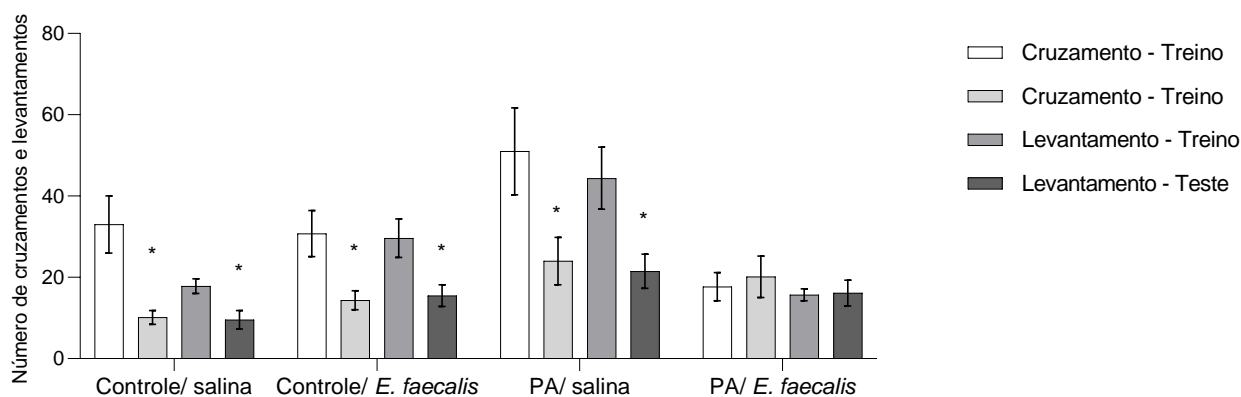
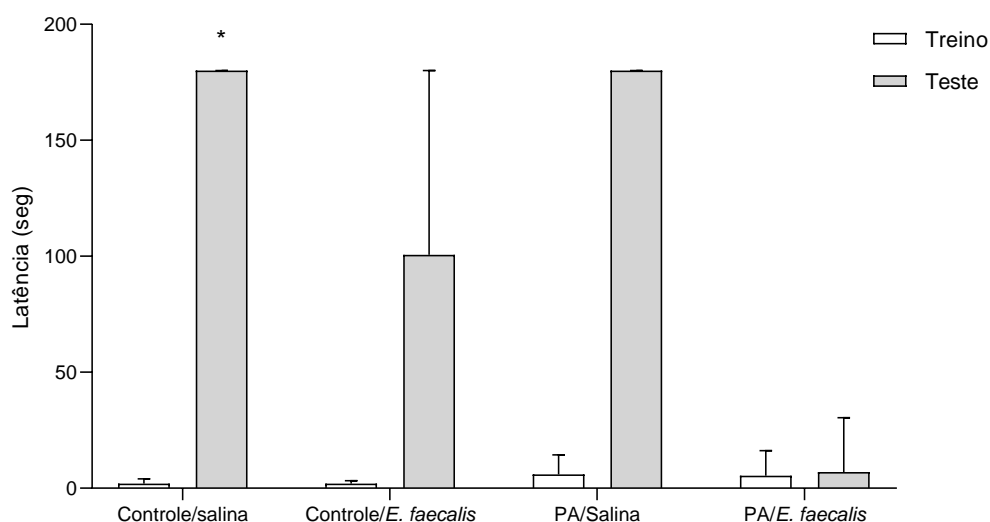


Figura 10: Teste de habituação a campo aberto em ratos Wistar adultos 10 dias após indução de PA. Os dados foram relatados como média  $\pm$  EPM, de 10 animais por grupo e as comparações dentro os grupos realizadas com teste t de *Student* pareado. \* $p < 0,05$  indicam significância estatística entre as sessões treino e teste. Figura elaborada pelo autor.

O teste comportamental de esQUIVA INIBITÓRIA é apresentado na figura 11. Em 10 dias após indução do modelo experimental (figura 11A), os dados demonstram preservação na memória aversiva apenas nos animais do grupo controle/salina, evidenciada pelo aumento no tempo de permanência no aparato durante a sessão teste quando comparado a sessão treino. Nos demais grupo não houve diferença no tempo de latência entre a sessão treino e teste, demonstrando comprometimento da memória aversiva ( $p < 0,05$ ).

Em 21 dias após a indução do modelo de PA (figura 11B), apenas o grupo PA/*E. faecalis* apresentou prejuízo de memória aversiva, não houve diferença entre as sessões, indicando comprometimento da memória aversiva.

11A)



11B)

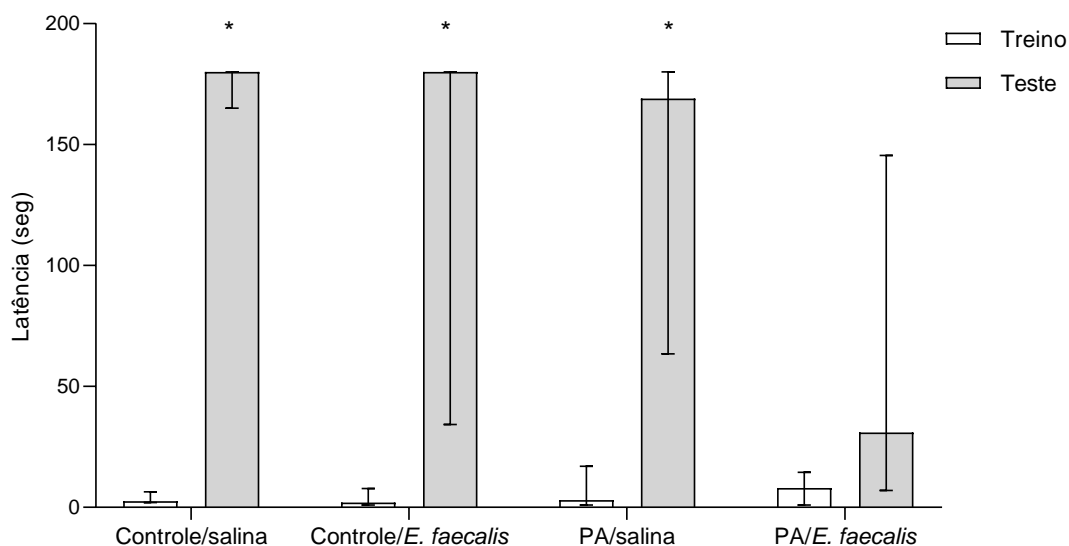


Figura 11: Teste de esquia inibitória em 10 (11A) e 21 dias (11B) após a indução da PA. Dados do teste de esquia inibitória foram apresentados como mediana e intervalo interquartil, de 10 animais por grupo e as comparações entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste U Mann-Whitney. O símbolo \* $p < 0,05$  indica diferença estatisticamente significativa quando comparado a sessão treino. Figura elaborada pelo autor.

### 4.3. CITOCINAS

#### 4.3.1. TNF- $\alpha$

No soro houve aumento significativo dos níveis de TNF- $\alpha$  nos grupos controle/*E. faecalis*, PA/salina e PA/*E. faecalis* comparados ao grupo controle/salina. No baço, foi observado aumento de TNF- $\alpha$  no grupo PA/*E. faecalis* comparado ao grupo controle/salina e ao grupo PA/salina. No coração, houve aumento nos grupos PA/salina e PA/*E. faecalis* comparados ao controle. No timo não foram observadas diferenças estatísticas (figura 12).

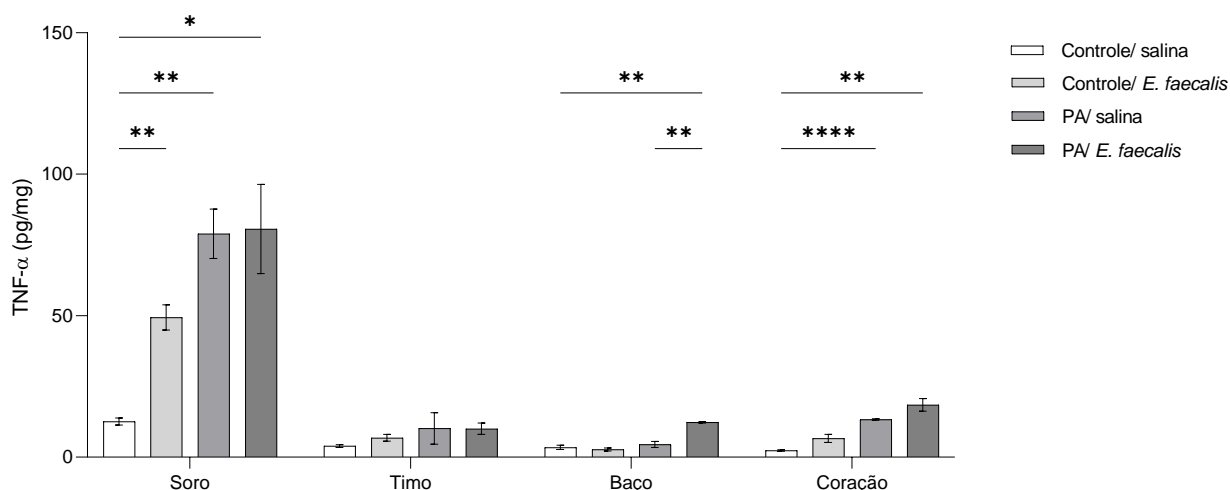


Figura 12. Níveis de TNF- $\alpha$ . O gráfico acima mostra os resultados obtidos na quantificação dos níveis de TNF- $\alpha$  nos diferentes tipos órgãos nos diferentes grupos 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média  $\pm$  EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando 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.

#### 4.3.2. IL 1 $\beta$

Como mostra a figura 13, foi observado um aumento nos níveis de IL-1 $\beta$  aumentaram no soro, baço e coração dos animais do grupo PA/*E. faecalis* quando comparado ao grupo controle/salina ( $p = 0,0030$ ,  $p = 0,0217$  e  $p = 0,0356$ , respectivamente). No timo não houve diferença estatística.

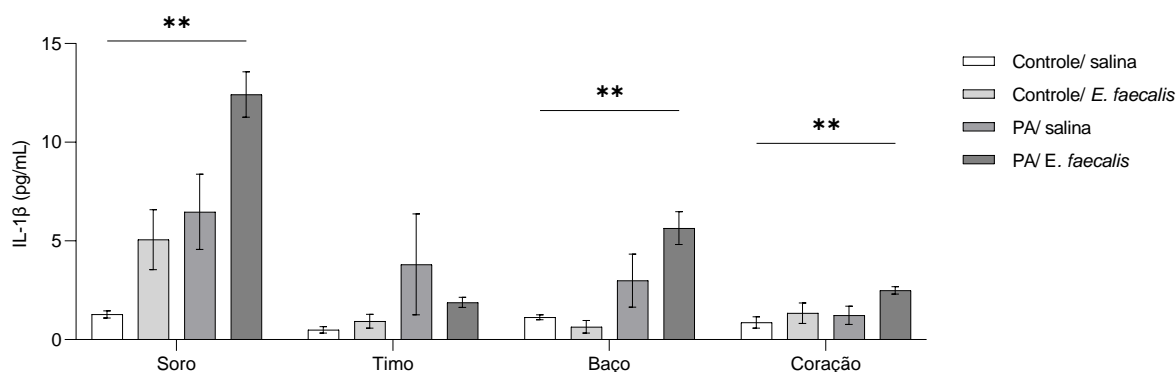


Figura 13. Níveis de IL-1 $\beta$ . O gráfico acima mostra os resultados obtidos na quantificação dos níveis IL-1 $\beta$  nos diferentes tipos órgãos e nos diferentes grupos 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média  $\pm$  EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando teste 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.

#### 4.3.3. IL-6

Quando avaliado os níveis de IL-6 (figura 14) foi observado aumento no soro nos grupos PA/salina ( $p = 0,0086$ ) e PA/*E. faecalis* ( $p = 0,0009$ ) comparados ao controle/salina. Ainda, houve aumento no grupo PA/*E. faecalis* comparado ao grupo PA/salina ( $p = 0,0007$ ). No timo ( $p = 0,0123$ ) e baço ( $p = 0,0146$ ) houve aumento dos níveis de IL-6 no grupo PA/*E. faecalis* comparado ao grupo controle/salina. No coração, foi observado aumento nos grupos PA/salina ( $p = 0,0460$ ) e PA/*E. faecalis* ( $p = 0,0004$ ) comparados ao controle/salina. Além disso, houve aumento no grupo PA/*E. faecalis* comparado ao grupo PA/salina ( $p = 0,0232$ ).

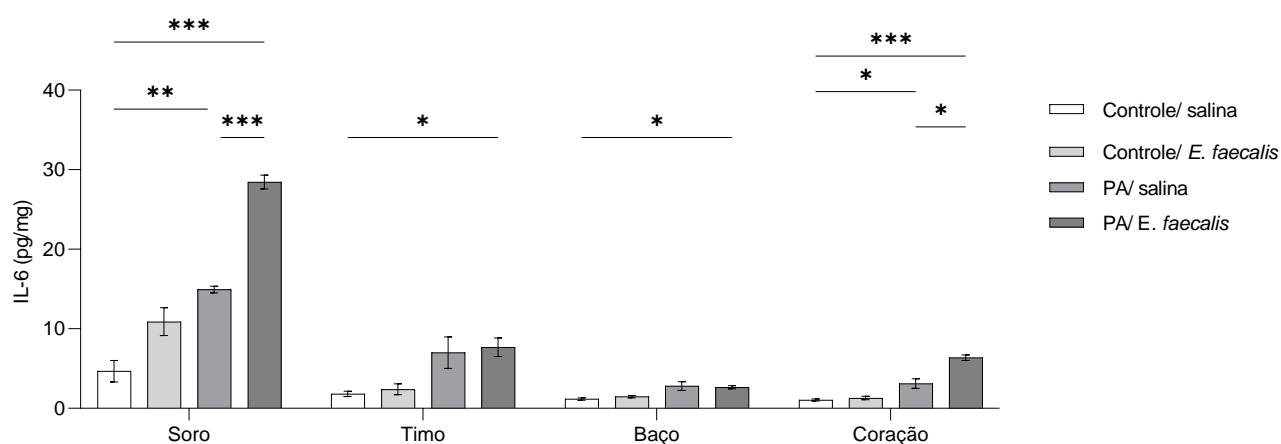


Figura 14. Níveis de IL-6. O gráfico acima mostra os resultados obtidos na quantificação dos níveis IL-6 nos diferentes tipos órgãos e nos diferentes grupos 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média  $\pm$  EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando teste

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.

#### 4.3.4. IL-10

Ao avaliar os níveis de IL-10, figura 15, observou-se aumento no soro do grupo PA/ *E. faecalis* quando comparado aos grupos controle/salina ( $p = 0,0054$ ) e PA/salina ( $p = 0,0114$ ). Houve aumento também no baço e coração nos grupos PA/*E. faecalis* ( $p = 0,0061$  e  $p = 0,0280$ , respectivamente) comparado ao grupo controle/salina.

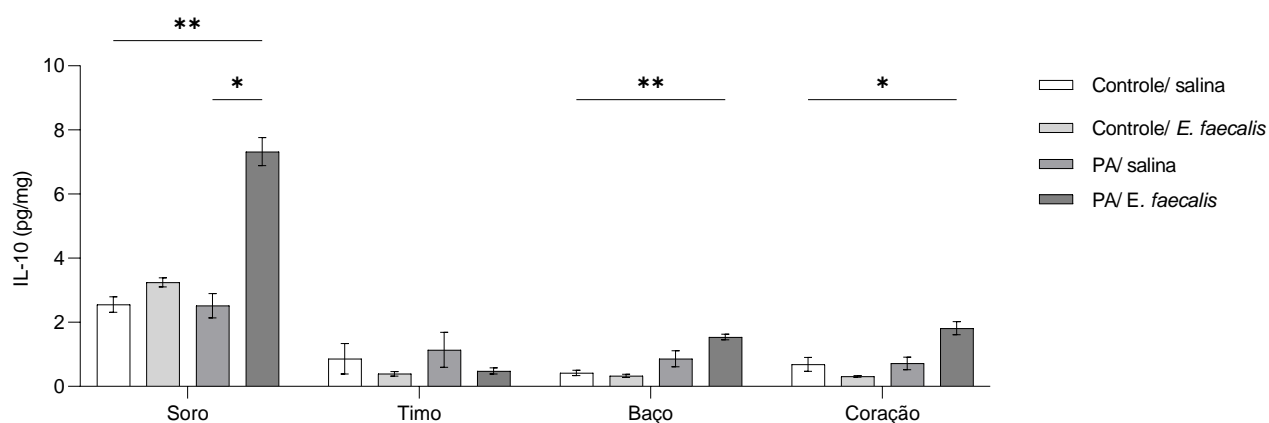


Figura 15. Níveis de IL-10. O gráfico acima mostra os resultados obtidos na quantificação dos níveis IL-10, nos diferentes tipos órgãos e nos diferentes grupos 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média  $\pm$  EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando teste ANOVA de 2 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. Dano oxidativo

Os níveis de produção de EROs foram avaliados por DCF (figura 16). No soro e timo, houve aumento de DCF nos grupos PA/salina e PA/ *E. faecalis* comparados ao grupo controle/salina ( $p < 0,0001$  em ambos). No baço e coração houve aumento de DCF nos grupos PA/salina e PA/ *E. faecalis* comparados ao grupo controle/salina. Ainda, houve uma exacerbação dos níveis de DCF no grupo PA/*E. faecalis* comparado ao grupo PA/salina.

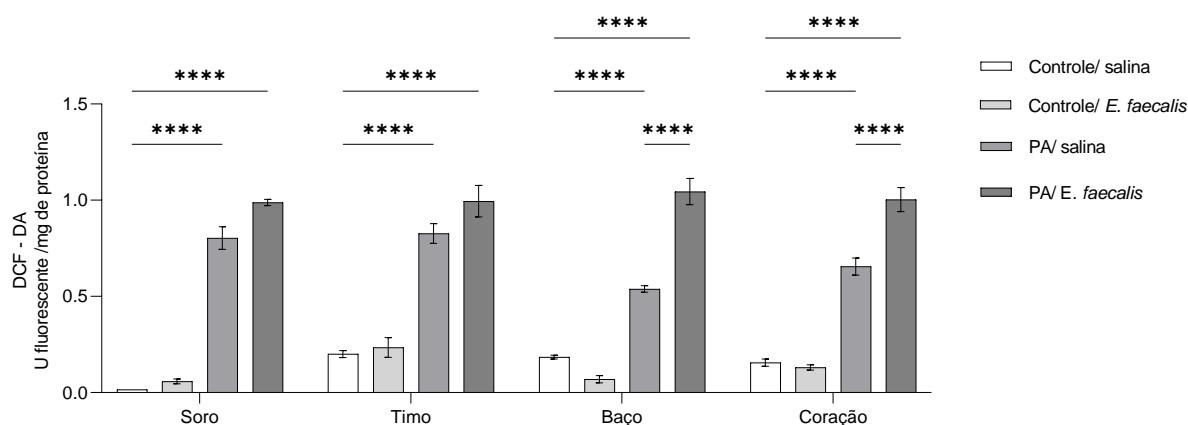


Figura 16. Níveis de produção de EROs por DCF-DA. O gráfico acima mostra os resultados obtidos na quantificação dos níveis DCF-DA nos diferentes tipos órgãos e nos diferentes grupos 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média  $\pm$  EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando 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.

Na figura 17 observa-se o resultado dos níveis de carbonilação de proteínas. Houve um aumento de carbonilação proteica no soro e timo dos grupos PA/salina ( $p = 0,0012$  e  $p = 0,0484$ , respectivamente) e PA/*E. faecalis* ( $p = 0,0254$  e  $p = 0,0003$ , respectivamente) comparados ao grupo controle/salina. No coração houve aumento dos níveis de carbonilação no grupo PA/*E. faecalis* ( $p = 0,0017$ ) comparado ao grupo controle/salina.

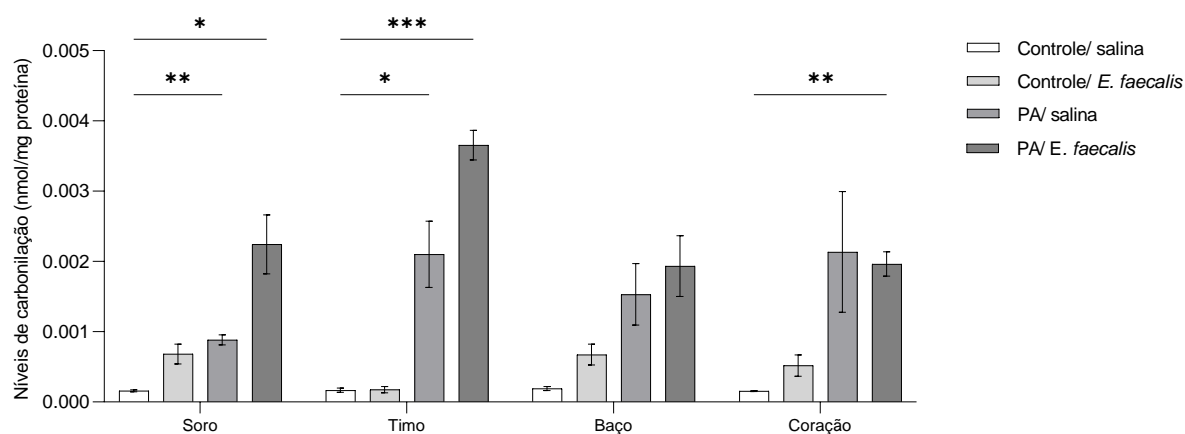


Figura 17. Níveis de carbonilação de proteínas. O gráfico acima mostra os resultados obtidos na quantificação dos níveis de grupamento carbonil, nos diferentes tipos de órgãos e nos diferentes grupos 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média  $\pm$  EPM, de 5 animais por grupo e as 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.

Na figura 18 são apresentados os níveis de MDA. No soro houve aumento de MDA nos grupos controle/*E. faecalis* ( $p = 0,0125$ ), PA/salina ( $p = 0,0022$ ) e PA/*E.*

*faecalis* ( $p = 0,0027$ ) comparados ao grupo controle/salina. No timo, baço e coração dos animais do grupo PA/*E. faecalis* houve aumento de MDA quando comparado ao grupo controle/*E. faecalis* (timo  $p = 0,0227$ , baço  $p = 0,0050$ , coração  $p = 0,0081$ ) e ao grupo controle/salina (timo  $p = 0,0004$ , baço  $p = 0,0012$ , coração  $p < 0,0001$ ).

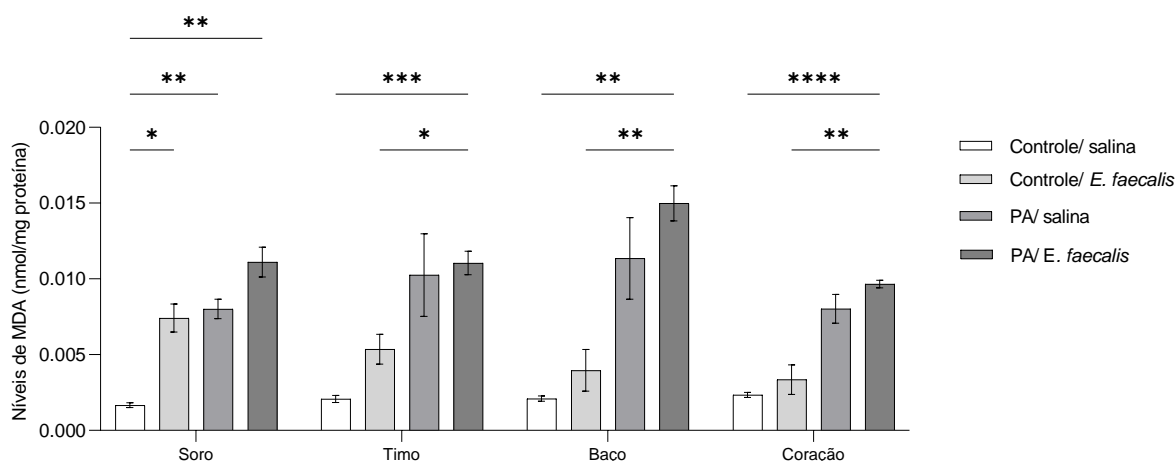


Figura 18. Níveis de peroxidação lipídica. O gráfico acima mostra os resultados obtidos na quantificação dos níveis de malondialdeído (MDA), nos diferentes tipos de órgãos e nos diferentes grupos 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média  $\pm$  EPM, de 5 animais por grupo e as comparações 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.

A atividade da SOD foi aumentada no baço do grupo PA/*E. faecalis* comparado ao grupo PA/salina ( $p = 0,0331$ ). No coração houve aumento de atividade enzimática no grupo PA/*E. faecalis* comparado ao grupo controle/salina ( $p = 0,0053$ ) e ao grupo PA/salina ( $p = 0,0019$ ) (Figura 19).

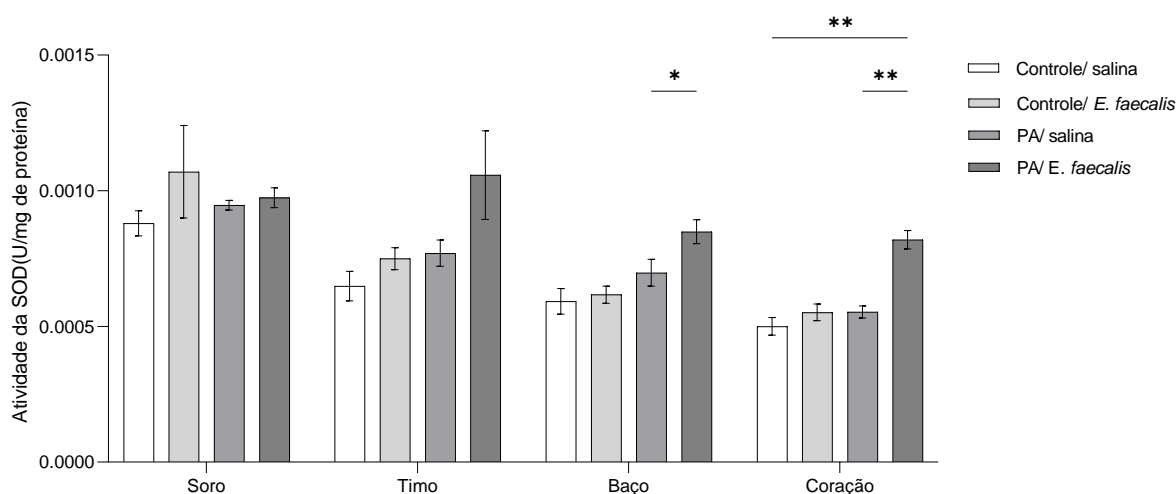


Figura 19. Atividade da SOD. O gráfico acima mostra os resultados obtidos na quantificação dos níveis de SOD nos diferentes tipos de órgãos e nos diferentes grupos 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média  $\pm$  EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando teste ANOVA de 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.

Na figura 20 a atividade da CAT foi aumentada no soro do grupo PA/*E. faecalis* quando comparado ao grupo PA/salina ( $p = 0,0003$ ) e ao grupo controle/salina ( $p = 0,0001$ ). No timo a CAT estava com atividade aumentada no grupo PA/salina ( $p = 0,0006$ ) e PA/*E. faecalis* ( $p = 0,0078$ ) ao grupo controle/salina. No baço a atividade da CAT estava aumentada grupo PA/*E. faecalis* quando comparada ao grupo controle/salina ( $p = 0,0011$ ) e PA/salina ( $p = 0,0253$ ). No coração a CAT estava com atividade aumentada nos grupos PA/*E. faecalis* ( $0.0075$ ) e PA/salina ( $0,0399$ ) quando comparados ao grupo controle/salina.

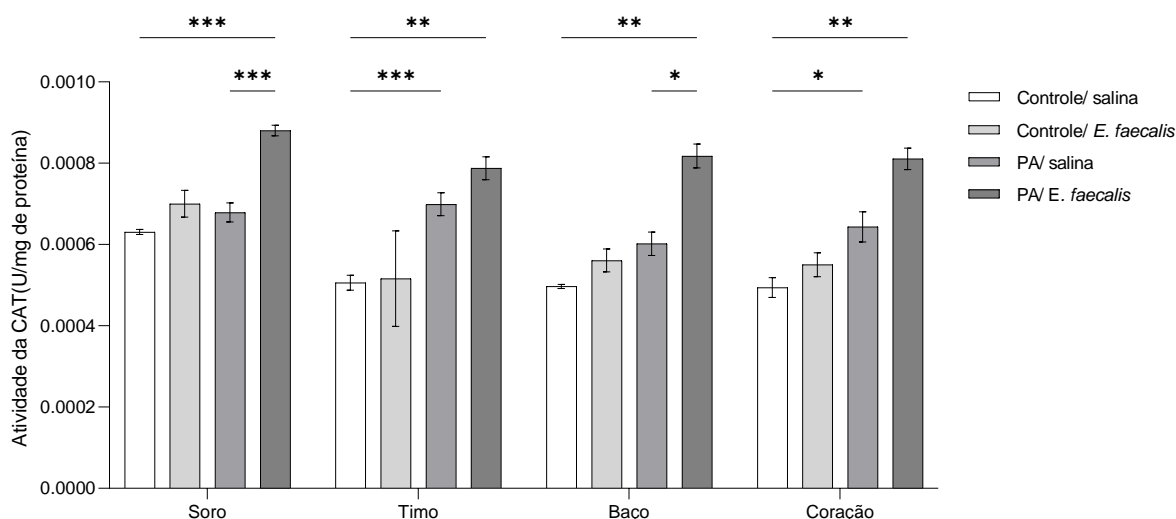


Figura 20. Atividade de CAT. O gráfico acima mostra os resultados obtidos na quantificação dos níveis de CAT nos diferentes tipos de órgãos e nos diferentes grupos 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média  $\pm$  EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando teste ANOVA de 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.

## 4.5. Estruturas

### 4.5.1. Baço

Na figura 21 são demonstrados os resultados do baço. Não houve diferença significativa no tamanho (A e B), área (C), ou peso (D) do baço entre os grupos analisados ( $p > 0,05$ ).

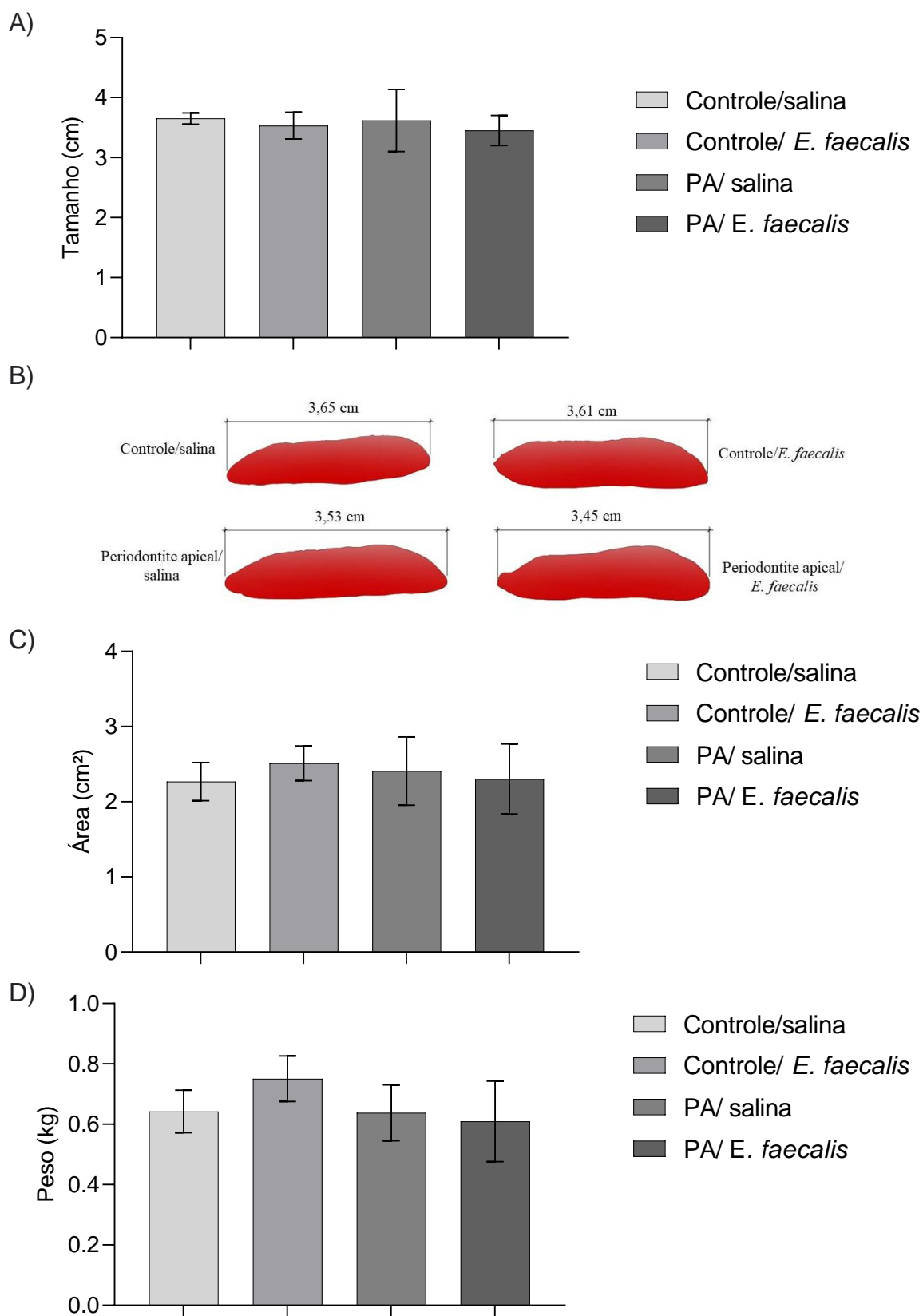


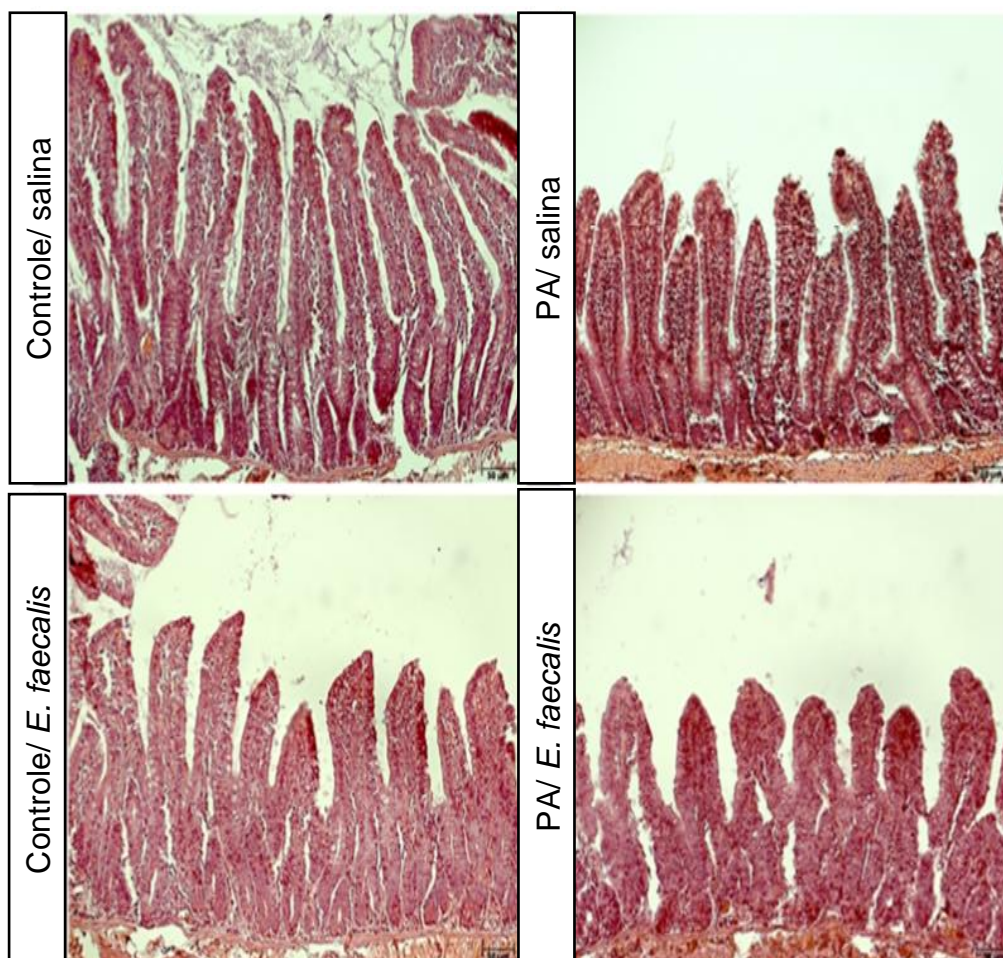
Figura 21. Análise do baço. A figura representa o tamanho (A e B), área (C), e peso (D) dos baços dos animais dos diferentes grupos experimentais 21 dias após a indução. Os dados foram relatados como média  $\pm$  EPM, de 5 animais por grupo e as comparações utilizando teste ANOVA de 2

vias,  $p < 0,05$  indica diferença estatisticamente significativa quando comparado entre os grupos. Figura elaborada pelo autor.

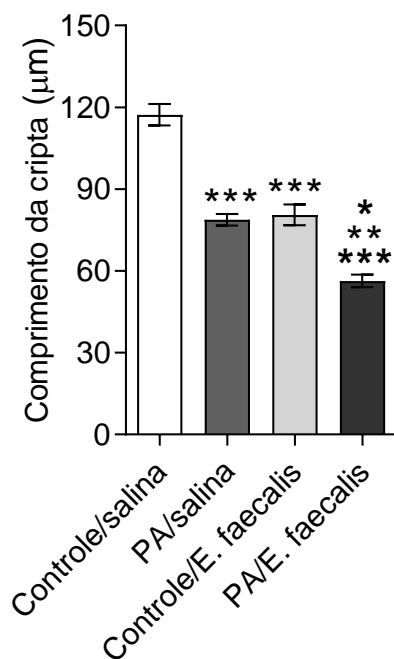
#### 4.5.2. Íleo

A figura 22A mostra que o comprimento das vilosidades (figura 22B) e das criptas (figura 22C) do íleo foi reduzido nos grupos PA/salina ( $p < 0,001$ ) e PA/*E. faecalis* ( $p < 0,001$ ) em comparação com seus grupos controle. A comparação entre os grupos induzidos à PA mostrou uma maior redução nas vilosidades e criptas ileais no grupo PA/*E. faecalis* ( $p < 0,05$ ).

22A)



22B)



22C)

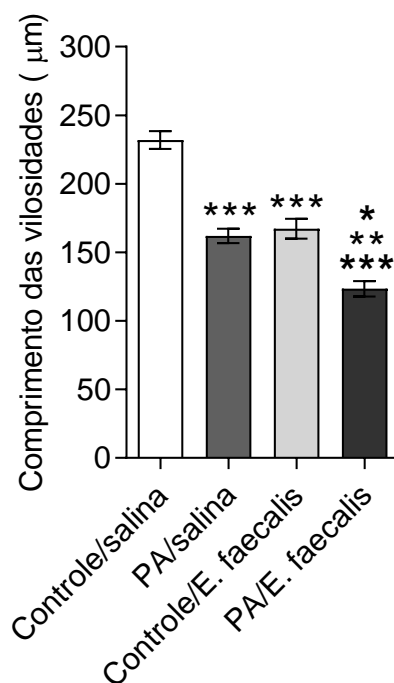


Figura 22. Análise do Íleo. A figura representa a coloração do íleo (A), comprimento das vilosidades do íleo (B) e das criptas (24C) nos animais dos diferentes grupos experimentais (barra de escala = 100 µm; ampliação, x 100). Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM para n=5 ratos. \* p < 0,05 indica diferença estatística comparado ao grupo controle. Figura elaborada pelo autor.

## 5. DISCUSSÃO

Os dentes sofrem injúrias diárias durante o decorrer da vida, sendo a principal delas a cárie dental. À medida que a cárie progride em direção à polpa, o biofilme responsável pela infecção também avança. Quando as camadas mais profundas da dentina são destruídas em cáries avançadas, a polpa dentária fica exposta ao biofilme e às bactérias planctônicas presentes na saliva (Siqueira, Rôças, Ricucci 2010). A polpa e os tecidos periapicais são assépticos, entretanto quando expostos a fatores patológicos, como microrganismos e seus fatores de virulência, e não tratados, desencadeiam inflamação, infecção pulpar e posteriormente PA, através da penetração dos túbulos dentinários a região apical dentária (Luo, Wan, Cheng *et al.* 2022). O processo desencadeador da PA normalmente segue-se à necrose pulpar decorrente de uma lesão cáriosa profunda (Georgiou, Crielaard, Armenis *et al.* 2019). Microrganismos oportunistas presentes na mucosa bucal podem invadir e disseminar-se ao sistema de canais radiculares por diferentes vias, sendo as lesões de cáries profundas, as lesões periodontais e os traumas os principais causadores desse tipo de patologia (Dioguardi, Di Gioia, Illuzzi *et al.* 2019). A patogênese da PA requer uma ação conjunta de bactérias em uma comunidade multiespécies cuja diversidade pode variar de acordo com o tipo de infecção e manifestação clínica da doença (Rodrigues, de Andrade, de Vasconcelos *et al.* 2018).

Doenças periodontais como a PA possuem grande relevância mundial, estando entre as dez infecções humanas mais prevalente no mundo. A PA é mediada por microrganismos comumente encontrados da cavidade oral (Velázquez-Moreno, González-Amaro, Aragón-Piña *et al.* 2023), sendo uma situação crônica e caracterizada por inflamação persistente e destruição óssea progressiva na região perirradicular (Tang, Zhang, Mei *et al.* 2022). Essa destruição óssea está relacionada a uma hiperestimulação dos osteoclastos, bem como o aumento da inflamação sistêmica que acompanha a replicação de microrganismos patogênicos relacionado as doenças bucais e crônicas (Chen, Wu, Chang 2017, Omi, Mishina 2022).

As bactérias residentes da cavidade oral foram detectadas em muitos órgãos e tecidos distintos, incluindo o intestino delgado, pulmões, coração, placenta e cérebro. Essas bactérias 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). Além das consequências locais da PA, a progressão e a exacerbação do processo infeccioso e inflamatório estão correlacionadas a resposta imune do infectado frente aos patógenos e seus produtos, já que um processo infeccioso local está conectado com o restante do corpo através dos vasos sanguíneos (Cintra, Estrela, Azuma *et al.* 2018, Yang, Shen, Zhang *et al.* 2023).

O patógeno mais comumente encontrado em processos infecciosos dentários é o *E. faecalis* (Vieira, Pérez, Alves *et al.* 2020). *E. faecalis* utiliza uma variedade de fatores de virulência para facilitar sua invasão ao hospedeiro e para manter-se em um estado ativo ao longo de uma infecção, podendo atuar de forma direta ou indireta. Na ação direta tem-se a liberação de enzimas que destroem células e tecidos do hospedeiro (Sakaguchi, Mikami, Wing *et al.* 2020, Felipe Pereira, Willian Lattari Tessarin, Yamamoto Chiba *et al.* 2021). Indiretamente, esses fatores interagem com células imunológicas para desencadear uma resposta inflamatória e prolongar a fase pró-inflamatória. As células imunológicas estimuladas liberam mediadores inflamatórios (anticorpos, metabólitos do ácido araquidônico e citocinas pró-inflamatórias) que causam danos adicionais aos tecidos do hospedeiro, podendo atingir a corrente sanguínea (Segura-Egea, Cabanillas-Balsera, Martín-González *et al.* 2023).

Este estudo a indução da PA em modelo animal de ratos Wistar seguiu modelo previamente estabelecido (Simões, Netto, Generoso *et al.* 2019). A contaminação destas lesões periodontais com a bactéria *E. faecalis* foi desencadeada com a finalidade de verificar seu envolvimento na inflamação sistêmica e alterações cognitivas em modelo experimental de PA. A confirmação do desenvolvimento da PA após a indução da lesão em 10 e 21 dias, foram realizadas por intermédio de TCFC nos animais submetidos ao modelo experimental de PA contaminados com *E. faecalis* e salina (Barichello, Netto, Ceretta *et al.* 2015). Verificou-se através dos exames de TCFC que no 10º dia, não houve formação de PA nos grupos PA salina e *E. faecalis*. Entretanto no 21º dia os animais submetidos ao modelo de PA apresentaram um aumento da radiolucidez apical quando comparados aos grupos controle/salina e controle/*E. faecalis*.

Um estudo recente identificou que o estresse e tensão aplicados sobre os tecidos dento alveolares, em 0 e 14 dias, demonstraram-se similares as

deformações em condições normais. Entretanto, quando avaliado após 28 dias, houve aumento significativos no estresse e tensão nos dentes lesados, favorecendo o aumento das PAs (Peng, Ma, Cao *et al.* 2022). Outro estudo, utilizando exames de imagem, demonstrou uma correlação entre a reabsorção e expansão da lesão, cujos resultados apresentaram resultados similares aos encontrados neste, com imagens de PA visíveis 14 dias após o modelo experimental, com seu tamanho máximo atingido em 28 dias (Minhoto, Khoury, Orozco *et al.* 2021). Frazão e colaboradores, em seu estudo experimental, identificaram volume da lesão maior em 28 do que em 14 dias, representado por microtomografia computadorizada. Os animais com lesão em 14 e 28 dias diminuíram o volume ósseo e espessura trabecular, entretanto apenas em 28 dias houve uma redução porcentagem de osso em relação ao volume total do tecido, bem como aumento de número trabecular e espaço trabecular (Frazão, Santos Mendes, Baia-da-Silva *et al.* 2023). Dessa forma, a biomecânica dental mostra-se prejudicada durante o desenvolvimento da PA, fator esse que pode contribuir para a lenta destruição e desintegração da estrutura dental na região apical e levar ao enfraquecimento e fratura dental (Huang, Xie, Xie *et al.* 2020), que também já foram evidenciadas após 12 semanas do início da lesão (Chen, Lei, Luo *et al.* 2019).

Para a avaliação comportamental dos animais acometidos pelas PAs, os testes comportamentais de campo aberto e esquiva inibitória foram realizados em 10 e 21 dias. Em 10 dias, verificou-se que os animais dos grupos controle/salina e controle/*E. faecalis* apresentaram diminuição no número de cruzamentos e levantamentos na sessão teste quando comparado a sessão treino, demonstrando preservação de memória de habituação nesses grupos. No entanto, nos grupos PA/salina e PA/*E. faecalis*, não houve diferença estatística entre as sessões, indicando prejuízo de memória de habituação nesses animais. Em 21 dias após a indução do modelo experimental o grupo PA/*E. faecalis* continuou apresentando prejuízo de memória de habituação, não havendo diferença entre as sessões treino e teste. Resultados similares foram evidenciados na literatura. Um estudo que associou meningite bacteriana e PA verificou através da tarefa de campo aberto, que não houve diferenças no número de cruzamentos e movimentos de elevação entre sessão de treinamento e teste nos grupos de meningite e lesão periapical, demonstrando comprometimento da memória de habituação (Barichello, Netto, Ceretta *et al.* 2015).

Com relação a memória aversiva, em 10 dias após indução do modelo experimental apenas os animais do grupo controle/salina demonstraram preservação desse tipo de memória, evidenciada pelo aumento no tempo de permanência no aparato, durante a sessão teste quando comparado a sessão treino. Nos demais grupo não houve diferença no tempo de latência entre a sessão treino e teste, demonstrando comprometimento da memória aversiva. Em 21 dias, apenas o grupo PA/*E. faecalis* apresentou comprometimento da memória aversiva, não havendo diferença entre as sessões, indicando dano cognitivo. A utilização deste teste comportamental no modelo de PA possui limitações na literatura, 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 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 (Ghafarimoghadam, Mashayekh, Gholami *et al.* 2022).

Os patógenos periodontais, como o *E. faecalis*, desencadeiam aumento de mediadores locais e sistêmicos acarretando respostas inflamatórias exacerbadas. Através de suas toxinas e fatores de virulência, como citolisina, proteínas de adesão, gelatinase e LTA (Siqueira, Rôças 2022, Park, Ha, Sim *et al.* 2023), podem induzir a ativação microglial e também desencadear respostas inflamatórias periféricas locais ou sistêmicas, com produção de mediadores inflamatórios (como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) (Hao, Li, Li *et al.* 2022, Wang, Huang, Chan *et al.* 2023). *E. faecalis* pode diminuir a ativação do NF- $\kappa$ B e a produção de citocinas pró-inflamatórias no sangue, IL-1 $\beta$ , IL-17 e interferon- $\gamma$ , em macrófagos infectados, contribuindo para sua sobrevivência e resistência à erradicação devido ao efeito imunossupressor. Todavia, esse microrganismo também pode induzir necroptose em macrófagos, causando danos teciduais e contribuindo para o desenvolvimento de PA persistente (Segura-Egea, Cabanillas-Balsera, Martín-González *et al.* 2023).

Nesse estudo foram avaliados os níveis de citocinas nos órgãos periféricos baço, timo e coração, bem como no soro dos animais. Em indivíduos saudáveis a concentração destes mediadores é em menor proporção quando comparados a pessoas doentes. A presença contínua destes marcadores em indivíduos saudáveis, pode representar uma inflamação sistêmica, sendo uma fonte importante de mensuração do impacto das doenças orais na saúde sistêmica (Georgiou, Crielaard, Ouwering *et al.* 2021).

Os níveis de TNF- $\alpha$  apresentaram aumento significativo no soro nos grupos controle/*E. faecalis*, PA/ salina e PA/*E. faecalis* comparados ao grupo controle/salina. No baço, foi observado aumento de TNF- $\alpha$  no grupo PA/*E. faecalis* comparado ao grupo controle/salina e ao grupo PA/salina. No coração, houve aumento nos grupos PA/salina e PA/*E. faecalis* comparados ao controle. Com relação aos níveis de IL-6 foi observado aumento no soro nos grupos PA/salina e PA/*E. faecalis* comparados ao controle/salina, e aumento no grupo PA/*E. faecalis* comparado ao grupo PA/salina. No timo e baço houve aumento dos níveis de IL-6 no grupo PA/*E. faecalis* comparado ao grupo controle/salina. No coração, foi observado aumento nos grupos PA/salina e PA/*E. faecalis* comparados ao controle/salina, bem como aumento no grupo PA/*E. faecalis* comparado ao grupo PA/salina.

O TNF- $\alpha$  é uma das principais citocinas pró-inflamatórias e seu aumento é comumente encontrado durante a PA, assim como de IL-6, sendo estas moléculas importantes para a diferenciação osteoclástica e a reabsorção óssea na cronificação da PA. Além de local, seus níveis já foram encontrados principalmente agrupadas ao redor do forame apical (Ye, Feng, Zhao *et al.* 2022). Sistemáticamente os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 foram demonstrados aumentados em regiões periapicais lesionadas e no fígado de ratos com abscessos periapicais induzidos (Bain, Lester, Henry *et al.* 2009). Corroborando com os resultados deste, pesquisas prévias usando modelos animais de PA em roedores descobriram que a lesão periapical pode alterar as citocinas inflamatórias séricas, como TNF- $\alpha$  e IL-6, assim como IL-18 e IL-17 (Cintra, Samuel, Azuma *et al.* 2016), com pico inflamatório em duas semanas após a indução, e desencadeando alterações no arco aórtico, miocárdio e baço (Zhang, Huang, Lu *et al.* 2016). Um estudo clínico avaliou pacientes com PA em comparação saudáveis e o risco de desenvolvimento de dano cardíaco, e demonstrou que a presença de PA estava correlacionada com níveis sanguíneos mais elevados de IL-1, IL-2 e IL-6 e diminuição da medida da reserva de fluxo endotelial cardíaco, sugerindo a existência de uma disfunção endotelial precoce em adultos jovens com PA (Cotti, Dessì, Piras *et al.* 2011).

Os níveis de IL-1 $\beta$  aumentaram no soro, baço e coração dos animais do grupo PA/*E. faecalis* quando comparado ao grupo controle/salina. Estudos avaliando diferentes órgãos e do desenvolvimento de PA são limitados. Níveis aumentados de de IL-1 $\beta$  foram evidenciados em tecido hepático em modelo animal de PA crônica e fibrose hepática (Gan, Luo, Zeng *et al.* 2024). A citocina pró-inflamatória IL-1 é um

regulador chave das respostas do hospedeiro à infecção microbiana e pode aumentar a reabsorção óssea e inibir a formação óssea (Ng, Mann, Rahbaran *et al.* 2008). Além disso, a IL-1 $\beta$  também pode desempenhar um papel na iniciação e regulação positiva da resposta inflamatória na PA, aumentando os níveis de produção de IL-6 e prostaglandina E2 (Martinho, Chiesa, Leite *et al.* 2012). A presença de biomarcadores pró-inflamatórios, como interleucinas, como IL-1 $\beta$ , na corrente sanguínea está positivamente correlacionada com a ocorrência e intensidade da inflamação sistêmica (Sirin, Ozcelik, Ersahan *et al.* 2021). No estudo de Wang e colaboradores, foi demonstrado que a expressão de NLRP3, IL-1 $\beta$  e caspase-1 foi aumentada no tecido periapical após a inoculação de *E. faecalis* (Wang, Jin, Ye *et al.* 2016).

Os níveis de IL-10 apresentaram aumento no soro do grupo PA/ *E. faecalis* quando comparado aos grupos controle/salina e PA/salina. Houve aumento também no baço e coração nos grupos PA/*E. faecalis* comparado ao grupo controle/salina. A citocina IL-10 possui características imunomoduladoras que suprimem a resposta imune celular com efeito anti-inflamatório e aumenta a resposta imune humoral e a produção de anticorpos (Palafox-Sánchez, Oregon-Romero, Salazar-Camarena *et al.* 2015). Estudos de inflamação crônica odontológica demonstram seu papel negativamente correlacionada com os sintomas clínicos, ou seja, níveis mais elevados de IL-10 e menor sintomatologia (Cotti, Schirru, Acquas *et al.* 2014). Em um estudo de abscessos apicais agudos, níveis séricos de IL-10 correlacionaram-se positivamente com a IL-6, sugerindo que seu principal efeito é de regulação dos efeitos pró-inflamatórios da IL-6 e do TNF- $\alpha$ , sendo esse equilíbrio importante para controlar a reação inflamatória e fornecer condições para o início do processo reparador (Palafox-Sánchez, Cruz, Salazar-Camarena *et al.* 2023).

Outro parâmetro avaliado neste estudo foram os danos oxidativos sendo avaliados a peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas, EROs por DCFH, e atividade de SOD e CAT. O dano oxidativo ocorre quando níveis de EROs sobrecarregam a capacidade das células de neutralizá-los por meio de mecanismos antioxidantes naturais, causado pelo estresse oxidativo. Os mediadores inflamatórios são ativados pelas EROs produzidas e liberadas durante a inflamação e que possuem papel sinalizador na resposta imune inata (DeJulius, Dollinger, Kavanaugh *et al.* 2021). Na cavidade oral, o dano oxidativo é mediado por

comunidades bacterianas específicas de cada indivíduo, como o *E. faecalis*, conhecido por exacerbar e induzir a produção de EROs (Jakovljevic, Nikolic, Jacimovic *et al.* 2020). Além disso, nas últimas décadas, surgiram evidências de uma associação entre o aumento de radicais livres e várias doenças, incluindo doenças neurodegenerativas, vasculares (como aterosclerose) e reumáticas (Martínez-García, Hernández-Lemus 2021)

No soro e timo, houve aumento de EROs e de carbonilação proteica nos grupos PA/salina e PA/ *E. faecalis* comparados ao grupo controle/salina. No baço e coração houve aumento de EROs nos grupos PA/salina e PA/ *E. faecalis* comparados ao grupo controle/salina e exacerbação dos níveis de EROs no grupo PA/*E. faecalis* comparado ao grupo PA/salina. No coração houve aumento dos níveis de carbonilação no grupo PA/*E. faecalis* comparado ao grupo controle/salina. Corroborando com os resultados encontrados nesse estudo, níveis mais altos de oxidantes no plasma já foram identificados na literatura em humanos, medidos como aumento de metabólitos reativos de oxigênio plasmático e menor potencial antioxidante em comparação com indivíduos saudáveis sendo o tratamento endodôntico uma alternativa restauradora do equilíbrio oxidativo sistêmico (Inchingolo, Marrelli, Annibali *et al.* 2014). Um estudo clínico comparou os níveis de estresse oxidativo na saliva e localmente (endodôntico) em pacientes com PA sendo encontrado uma correlações positivamente significativa entre marcadores de EROs na saliva, lesão periapical e dor (Vengerfeldt, Mändar, Saag *et al.* 2017). Além disso, um estudo clínico, que abordou a infecção endodôntica e a disfunção endotelial, mostrou que os valores de EROs no soro aumentaram significativamente apenas em mulheres (Cotti, Zedda, Deidda *et al.* 2015). Sabe-se que a produção de EROs aumenta em resposta à reabsorção óssea alveolar, e após a sua liberação local essas moléculas podem entrar na circulação sistêmica. Com isso, a oxidação de biomoléculas leva à circulação de EROs, que pode danificar vários órgãos (Leong, Ng, Badiah *et al.* 2014).

A peroxidação lipídica também foi avaliada, cujo soro apresentou aumento de MDA nos grupos controle/*E. faecalis*, PA/salina e PA/*E. faecalis* comparados ao grupo controle/salina. No timo, baço e coração dos animais do grupo PA/*E. faecalis* houve aumento de MDA quando comparado ao grupo controle/*E. faecalis* e ao grupo controle/salina. Um estudo com modelo animal de PA verificou que os níveis séricos de TBARS e glutathiona (GSH) foram aumentados após 14 dias

da lesão. No entanto, aos 28 dias, a resposta antioxidante diminuiu, com diminuição dos níveis de GSH e houve permanência do aumento em TBARS. Portanto, a resposta bioquímica oxidativa foi modulada de acordo com a progressão do dano periapical (Frazão, Santos Mendes, Baia-da-Silva *et al.* 2023).

A atividade de SOD e CAT também foram analisadas. A SOD foi aumentada no baço do grupo PA/*E. faecalis* comparado ao grupo PA/salina. No coração houve aumento de atividade enzimática no grupo PA/*E. faecalis* comparado ao grupo controle/salina e ao grupo PA/salina. Já a atividade da atividade da CAT foi aumentada no soro do grupo PA/*E. faecalis* quando comparado ao grupo PA/salina e ao grupo controle/salina. No timo a CAT estava com atividade aumentada no grupo PA/salina e PA/*E. faecalis* ao grupo controle/salina. No baço a atividade da CAT estava aumentada grupo PA/*E. faecalis* quando comparada ao grupo controle/salina e PA/salina. No coração a CAT estava com atividade aumentada nos grupos PA/*E. faecalis* e PA/salina quando comparados ao grupo controle/salina. Em um estudo prévio que avaliou o papel oxidativo periférico em modelo animal de PA, verificou-se redução das atividades da enzima antioxidante catalase 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). Um estudo recente encontrou aumento dos níveis de ânion superóxido significativamente maiores no grupo hipertensão + PA do que nos grupos PA, hipertensão e controle, demonstrando uma correlação entre os efeitos oxidativos e controle da pressão arterial. Além disso, a atividade da SOD no homogeneizado de tecido cardíaco foram significativamente menores nos grupos PA e hipertensão + PA quando comparado ao controle (Milojevic Samanovic, Jakovljevic, Vasovic *et al.* 2021). A PA experimental foi associada ao aumento da atividade da creatina quinase, fosfatase alcalina, lactato desidrogenase e produção EROs, bem como à diminuição da atividade da SOD e CAT no tecido cardíaco após 28 dias da indução (Sehirli, Aksoy, Kermeoglu *et al.* 2019).

Neste estudo também foram avaliados o baço e íleo dos animais induzidos ao modelo experimental de PA. No baço não houve diferenças significativas entre os grupos. Entretanto no íleo o comprimento das vilosidades do íleo e das criptas foi reduzido nos grupos PA/ salina e PA/ *E. faecalis* em comparação com seus grupos controle. A comparação entre os grupos induzidos à PA mostrou uma maior redução nas vilosidades e criptas ileais no grupo PA/*E.*

*faecalis*. Similarmente aos resultados encontrados nesse estudo, uma pesquisa que utilizou *F. nucleatum* na indução de PA alterou a flora intestinal e interrompeu a homeostase intestinal em ratos (Haraga, Sato, Watanabe *et al.* 2022). Similarmente Lee e colaboradores, em modelo animal com *F. nucleatum* e periodontite, encontraram interrupção do equilíbrio da microbiota intestinal em ratos. Além disso, embora *F. nucleatum* não tenha se estabelecido no intestino no estágio inicial da periodontite, ele alterou a microbiota do intestino e dos órgãos circundantes (coração, fígado, rins) conforme a progressão da doença. Sendo assim, a disbiose intestinal pode diminuir o efeito anti-inflamatório de bactérias benéficas no epitélio da mucosa intestinal (Lee, Haraga, Satoh *et al.* 2024). Um estudo recente identificou os efeitos da PA crônica na barreira intestinal, revelando a ruptura da camada de muco e junções estreitas. Na análise de imunofluorescência revelou-se expressão reduzida de proteínas de junção no epitélio colônico proximal, sugerindo integridade prejudicada do tecido intestinal (Gan, Luo, Zeng *et al.* 2024).

A desregulação da microflora intestinal leva ao aumento da permeabilidade das barreiras intestinais, resultando em aumento da penetração de produtos derivados do intestino grosso do sangue para o restante do corpo, sendo assim muitos metabólitos produzidos pela microbiota intestinal podem afetar direta ou indiretamente a função cerebral e de outros órgãos periféricos (Sochocka, Donskow-Łysoniewska, Diniz *et al.* 2019, Panthee, Paudel, Hamamoto *et al.* 2021). Os mecanismos que correlacionam a doença endodôntica às doenças sistêmicas podem se assemelhar entre as associações de doença periodontal e doença coronariana, em que uma resposta inflamatória localizada, devido a lesão endodôntica decorrente da infecção bacteriana, como por *E. faecalis*, leva à liberação de citocinas na circulação sistêmica e a subsequentes efeitos vasculares deletérios (Conti, Segura-Egea, Cardoso *et al.* 2020). Além disso, o processo infeccioso causado por *E. faecalis* promove o desenvolvimento de PA refratária (PAR), com base na análise de amostras clínicas humanas, modelos animais e culturas celulares. Esse processo necrótico contribui para a formação de microlesões cardíacas durante infecção bacteriana grave por *E. faecalis* em camundongos, e essa resposta inflamatória do hospedeiro à infecção e sua infiltração está correlacionada ao aumento da expressão dos marcadores inflamatórios IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . 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

Os resultados demonstram que a infecção periodontal provocada por *E. faecalis* pode ter um impacto negativo significativo na função cognitiva, especificamente na memória aversiva, sendo este um dos poucos estudos a abordar essa metodologia.

Neste estudo foi identificado que em 21 dias após o desenvolvimento de PA os animais apresentaram danos nas estruturas ósseas dentárias, características da PA. Além disso, inicialmente em 10 dias os animais dos grupos PA, controle/ *E. faecalis* e PA/ *E. faecalis* apresentaram dano de memória, entretanto aos 21 dias somente o grupo PA/ *E. faecalis* manteve o dano de memória de longo prazo e aversiva quando comparados aos controles. Com relação aos parâmetros inflamatórios, verificou-se que os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 e parâmetros oxidativos estiveram exacerbados em praticamente todos os grupos, com exceção do grupo controle/ salina, no soro e nas estruturas periféricas baço, timo e coração. Além disso, o grupo PA/ *E. faecalis* demonstrou diferença de seus níveis comparado ao grupo controle/salina e ao grupo PA/salina em praticamente todas as estruturas avaliadas. Na avaliação do íleo verificou-se ainda que o comprimento das vilosidades e das criptas foi reduzido nos grupos PA/ salina e PA/ *E. faecalis* em comparação com seus grupos controle, com piora expressiva no grupo PA/ *E. faecalis* quando comparado a PA/ salina.

Com estes resultados pressupõem-se que o processo infeccioso por *E. faecalis* exacerba parâmetros inflamatórios e oxidativos em modelo animal de PA, resultando em EROs na circulação periférica, danos em órgãos secundários e aumento da permeabilidade intestinal. Além disso, os achados do estudo indicam uma conexão entre a saúde periodontal e a função cognitiva, sugerindo que a inflamação crônica associada à PA pode ter efeitos adversos no SNC, comprometendo a memória aversiva e possivelmente outras funções cognitivas.

## REFERÊNCIAS

- 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.
- Azuma, M.M., Cardoso, C.B.M., Samuel, R.O., Pipa, C.B., Bomfim, S.R.M., Narciso, L.G., Gomes-Filho, J.E. and Cintra, L.T.A. "Omega-3 Fatty Acids Alter Systemic Inflammatory Mediators Caused by Apical Periodontitis." **J Endod**, 47(2): 272-277. 2021.
- Baima, G., Shin, H.S., Arrica, M., Laforí, A., Cordaro, M. and Romandini, M. "The co-occurrence of the two main oral diseases: periodontitis and dental caries." **Clin Oral Investig**, 27(11): 6483-6492. 2023.
- Bain, J.L., Lester, S.R., Henry, W.D., Naftel, J.P. and Johnson, R.B. "Effects of induced periapical abscesses on rat pregnancy outcomes." **Arch Oral Biol**, 54(2): 162-171. 2009.
- 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.
- Ben Braïek, O. and Smaoui, S. "Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics." **Biomed Res Int**, 2019: 5938210. 2019.
- Berlinck, T., Tinoco, J.M., Carvalho, F.L., Sassone, L.M. and Tinoco, E.M. "Epidemiological evaluation of apical periodontitis prevalence in an urban Brazilian population." **Braz Oral Res**, 29: 51. 2015.
- Bevilaqua, L.R., Kerr, D.S., Medina, J.H., Izquierdo, I. and Cammarota, M. "Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task." **Eur J Neurosci**, 17(4): 897-902. 2003.
- Boeder, A.M., Spiller, F., Carlstrom, M. and Izídio, G.S. "Enterococcus faecalis: implications for host health." **World J Microbiol Biotechnol**, 40(6): 190. 2024.

Caplan, D.J., Pankow, J.S., Cai, J., Offenbacher, S. and Beck, J.D. "The relationship between self-reported history of endodontic therapy and coronary heart disease in the Atherosclerosis Risk in Communities Study." **J Am Dent Assoc**, 140(8): 1004-1012. 2009.

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.

Chi, D., Lin, X., Meng, Q., Tan, J., Gong, Q. and Tong, Z. "Real-Time Induction of Macrophage Apoptosis, Pyroptosis, and Necroptosis by *Enterococcus faecalis* OG1RF and Two Root Canal Isolated Strains." **Front Cell Infect Microbiol**, 11: 720147. 2021.

Childs, D.R. and Murthy, A.S. "Overview of Wound Healing and Management." **Surg Clin North Am**, 97(1): 189-207. 2017.

Chong, K.K.L., Tay, W.H., Janela, B., Yong, A.M.H., Liew, T.H., Madden, L., Keogh, D., Barkham, T.M.S., Ginhoux, F., Becker, D.L. and Kline, K.A. "Enterococcus faecalis Modulates Immune Activation and Slows Healing During Wound Infection." **J Infect Dis**, 216(12): 1644-1654. 2017.

Cintra, L.T., Samuel, R.O., Azuma, M.M., de Queiróz, A.O., Ervolino, E., Sumida, D.H., de Lima, V.M. and Gomes-Filho, J.E. "Multiple Apical Periodontitis Influences Serum Levels of Cytokines and Nitric Oxide." **J Endod**, 42(5): 747-751. 2016.

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.

Conti, L.C., Segura-Egea, J.J., Cardoso, C.B.M., Benetti, F., Azuma, M.M., Oliveira, P.H.C., Bomfim, S.R.M. and Cintra, L.T.A. "Relationship between apical periodontitis and atherosclerosis in rats: lipid profile and histological study." **Int Endod J**, 53(10): 1387-1397. 2020.

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.

Cotti, E., Dessì, C., Piras, A., Flore, G., Deidda, M., Madeddu, C., Zedda, A., Longu, G. and Mercurio, G. "Association of endodontic infection with detection of an initial lesion to the cardiovascular system." **J Endod**, 37(12): 1624-1629. 2011.

Cotti, E., Schirru, E., Acquas, E. and Usai, P. "An overview on biologic medications and their possible role in apical periodontitis." **J Endod**, 40(12): 1902-1911. 2014.

Cotti, E., Zedda, A., Deidda, M., Piras, A., Flore, G., Ideo, F., Madeddu, C., Pau, V.M. and Mercurio, G. "Endodontic infection and endothelial dysfunction are associated with different mechanisms in men and women." **J Endod**, 41(5): 594-600. 2015.

Daca, A. and Jarzembowski, T. "From the Friend to the Foe-Enterococcus faecalis Diverse Impact on the Human Immune System." **Int J Mol Sci**, 25(4). 2024.

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.

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.

Dessaune Neto, N., Porpino, M.T.M., Antunes, H.D.S., Rodrigues, R.C.V., Perez, A.R., Pires, F.R., Siqueira, J.F., Jr. and Armada, L. "Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine expression in post-treatment apical periodontitis." **J Appl Oral Sci**, 26: e20170455. 2018.

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.

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

Dupont, H., Friggeri, A., Touzeau, J., Airapetian, N., Tinturier, F., Lobjoie, E., Lorne, E., Hijazi, M., Régimbeau, J.M. and Mahjoub, Y. "Enterococci increase the morbidity and mortality associated with severe intra-abdominal infections in elderly patients hospitalized in the intensive care unit." **J Antimicrob Chemother**, 66(10): 2379-2385. 2011.

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." **Microb Pathog**, 183: 106337. 2023.

Felipe Pereira, R., Willian Lattari Tessarin, G., Yamamoto Chiba, F., Sara de Lima Coutinho Mattered, M., Gomes Pereira, A., Verônica Saori Tsosura, T., Gustavo Balera Brito, V., Akira Fujii de Oliveira, R., Ervolino, E., Helena Penha de Oliveira, S., Tavares Angelo Cintra, L. and Hissako Matsushita, D. "Apical periodontitis promotes

insulin resistance and alters adaptive immunity markers in rats." **Saudi Dent J**, 33(8): 979-986. 2021.

Fernández, A., Cárdenas, A.M., Astorga, J., Veloso, P., Alvarado, A., Merino, P., Pino, D., Reyes-Court, D. and Hernández, M. "Expression of Toll-like receptors 2 and 4 and its association with matrix metalloproteinases in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis." **Clin Oral Investiq**, 23(12): 4205-4212. 2019.

Fernández, A., Herrera, D., Hoare, A., Hernández, M. and Torres, V.A. "Lipopolysaccharides from *Porphyromonas endodontalis* and *Porphyromonas gingivalis* promote angiogenesis via Toll-like-receptors 2 and 4 pathways in vitro." **Int Endod J**, 56(10): 1270-1283. 2023.

Ferreira, R.O., Pereira, M.S., Souza-Monteiro, D., Frazão, D.R., de Moura, J.D.M., Baia-da-Silva, D.C., Bittencourt, L.O., Balbinot, G.S., Collares, F.M., Lima, M.L.S., de Araújo, A.A. and Lima, R.R. "Physical training attenuates systemic cytokine response and tissue damage triggered by apical periodontitis." **Sci Rep**, 14(1): 8030. 2024.

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.

Fox, M., Knorr, D.A. and Haptonstall, K.M. "Alzheimer's disease and symbiotic microbiota: an evolutionary medicine perspective." **Ann N Y Acad Sci**, 1449(1): 3-24. 2019.

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.

Fujihara, M., Muroi, M., Tanamoto, K., Suzuki, T., Azuma, H. and Ikeda, H. "Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex." **Pharmacol Ther**, 100(2): 171-194. 2003.

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.

Gan, G., Luo, Y., Zeng, Y., Lin, S., Lu, B., Zhang, R., Chen, S., Lei, H., Cai, Z. and Huang, X. "Gut microbiota dysbiosis links chronic apical periodontitis to liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: Insights from a mouse model." **Int Endod J**. 2024.

García-Solache, M. and Rice, L.B. "The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment." **Clin Microbiol Rev**, 32(2). 2019.

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.

Ghafarimoghadam, M., Mashayekh, R., Gholami, M., Fereydani, P., Shelley-Tremblay, J., Kandezi, N., Sabouri, E. and Motaghinejad, M. "A review of behavioral methods for the evaluation of cognitive performance in animal models: Current techniques and links to human cognition." **Physiol Behav**, 244: 113652. 2022.

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., Lence, L., Candiotta, G., Streck, E., Petronilho, F., Pillai, A., Sharshar, T., Dal-Pizzol, F. and Barichello, T. "A crosstalk between gut and brain in sepsis-induced cognitive decline." **J Neuroinflammation**, 19(1): 114. 2022.

Goldman, E., Reich, E., Abramovitz, I. and Klutstein, M. "Inducing Apical Periodontitis in Mice." **J Vis Exp**, (150). 2019.

Gomes, B. and Herrera, D.R. "Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology." **Braz Oral Res**, 32(suppl 1): e69. 2018.

Guneser, M.B. and Eldeniz, A.U. "The effect of gelatinase production of *Enterococcus faecalis* on adhesion to dentin after irrigation with various endodontic irrigants." **Acta Biomater Odontol Scand**, 2(1): 144-149. 2016.

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.

Haraga, H., Sato, T., Watanabe, K., Hamada, N. and Tani-Ishii, N. "Effect of the Progression of *Fusobacterium nucleatum*-induced Apical Periodontitis on the Gut Microbiota." **J Endod**, 48(8): 1038-1045. 2022.

Hernández-Ríos, P., Pussinen, P.J., Vernal, R. and Hernández, M. "Oxidative Stress in the Local and Systemic Events of Apical Periodontitis." **Front Physiol**, 8: 869. 2017.

Holland, R., Gomes, J.E.F., Cintra, L.T.A., Queiroz Í, O.A. and Estrela, C. "Factors affecting the periapical healing process of endodontically treated teeth." **J Appl Oral Sci**, 25(5): 465-476. 2017.

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, 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.

Inchingolo, F., Marrelli, M., Annibaldi, S., Cristalli, M.P., Dipalma, G., Inchingolo, A.D., Palladino, A., Inchingolo, A.M., Gargari, M. and Tatullo, M. "Influence of endodontic treatment on systemic oxidative stress." **Int J Med Sci**, 11(1): 1-6. 2014.

Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., de Souza, M.M., Izquierdo, L.A. and Medina, J.H. "Mechanisms for memory types differ." **Nature**, 393(6686): 635-636. 1998.

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.

Jenkinson, H.F. and Lamont, R.J. "Oral microbial communities in sickness and in health." **Trends Microbiol**, 13(12): 589-595. 2005.

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

Joshipura, K.J., Pitiphat, W., Hung, H.C., Willett, W.C., Colditz, G.A. and Douglass, C.W. "Pulpal inflammation and incidence of coronary heart disease." **J Endod**, 32(2): 99-103. 2006.

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.

Krawczyk, B., Wityk, P., Gałęcka, M. and Michalik, M. "The Many Faces of *Enterococcus* spp.-Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen." **Microorganisms**, 9(9). 2021.

Lee, S., Haraga, H., Satoh, T., Mutoh, N., Watanabe, K., Hamada, N. and Tani-Ishii, N. "Effect of periodontitis induced by *Fusobacterium nucleatum* on the microbiota of the gut and surrounding organs." **Odontology**, 112(1): 177-184. 2024.

Leng, S., Xu, W., Wu, L., Liu, L., Du, J., Yang, F., Huang, D. and Zhang, L. "NLRP3 Disturbs Treg/Th17 Cell Balance to Aggravate Apical Periodontitis." **J Dent Res**, 102(6): 656-666. 2023.

Leong, X.F., Ng, C.Y., Badiah, B. and Das, S. "Association between hypertension and periodontitis: possible mechanisms." **ScientificWorldJournal**, 2014: 768237. 2014.

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., Ling, J. and Jiang, Q. "Inflammasomes in Alveolar Bone Loss." **Front Immunol**, 12: 691013. 2021.

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.

Li, Y., Xiang, Y., Ren, H., Zhang, C., Hu, Z., Leng, W. and Xia, L. "Association between periodontitis and dental caries: a systematic review and meta-analysis." **Clin Oral Investig**, 28(6): 306. 2024.

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.

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, W.L., Song, D.Z., Yue, J.L., Wang, T.T., Zhou, X.D., Zhang, P., Zhang, L. and Huang, D.M. "NLRP3 inflammasome may regulate inflammatory response of human periodontal ligament fibroblasts in an apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC)-dependent manner." **Int Endod J**, 50(10): 967-975. 2017.

Luo, X., Wan, Q., Cheng, L. and Xu, R. "Mechanisms of bone remodeling and therapeutic strategies in chronic apical periodontitis." **Front Cell Infect Microbiol**, 12: 908859. 2022.

Ma, R.Y., Deng, Z.L., Du, Q.Y., Dai, M.Q., Luo, Y.Y., Liang, Y.E., Dai, X.Z., Guo, S.M. and Zhao, W.H. "Enterococcus faecalis Extracellular Vesicles Promote Apical Periodontitis." **J Dent Res**, 103(6): 672-682. 2024.

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

Martinho, F.C., Chiesa, W.M., Leite, F.R., Cirelli, J.A. and Gomes, B.P. "Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content." **J Endod**, 38(6): 740-745. 2012.

Milojevic Samanovic, A., Jakovljevic, V., Vasovic, M., Mitrovic, S., Rankovic, M., Mihajlovic, K., Bolevich, S. and Zivkovic, V. "Cardiac, biochemical and histopathological analysis reveals impaired heart function in hypertensive rats with apical periodontitis." **Int Endod J**, 54(9): 1581-1596. 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.

Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P. and Malik, A.B. "Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury." **Antioxid Redox Signal**, 20(7): 1126-1167. 2014.

Monroe, D. "Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms." **PLoS Biol**, 5(11): e307. 2007.

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

Ng, Y.L., Mann, V., Rahbaran, S., Lewsey, J. and Gulabivala, K. "Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature -- Part 2. Influence of clinical factors." **Int Endod J**, 41(1): 6-31. 2008.

Niazi, S.A. and Bakhsh, A. "Association between Endodontic Infection, Its Treatment and Systemic Health: A Narrative Review." **Medicina (Kaunas)**, 58(7). 2022.

Nielsen, H.V., Flores-Mireles, A.L., Kau, A.L., Kline, K.A., Pinkner, J.S., Neiers, F., Normark, S., Henriques-Normark, B., Caparon, M.G. and Hultgren, S.J. "Pilin and sortase residues critical for endocarditis- and biofilm-associated pilus biogenesis in *Enterococcus faecalis*." **J Bacteriol**, 195(19): 4484-4495. 2013.

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

Palafox-Sánchez, C.A., Cruz, A., Salazar-Camarena, D.C., Gascón, L.G., Cintra, L.T.A., Muñoz-Valle, J.F., García-Arellano, S., Estrela, C. and Menchaca-Tapia, P.A. "Evaluation of Serum Levels of Cytokines in Acute Apical Abscess: A Longitudinal Observational Study." **J Endod**, 49(9): 1090-1098. 2023.

Palafox-Sánchez, C.A., Oregon-Romero, E., Salazar-Camarena, D.C., Valle, Y.M., Machado-Contreras, J.R., Cruz, A., Orozco-López, M., Orozco-Barocio, G., Vázquez-Del Mercado, M. and Muñoz-Valle, J.F. "Association of interleukin-10 promoter haplotypes with disease susceptibility and IL-10 levels in Mexican patients with systemic lupus erythematosus." **Clin Exp Med**, 15(4): 439-446. 2015.

Panthee, S., Paudel, A., Hamamoto, H., Ogasawara, A.A., Iwasa, T., Blom, J. and Sekimizu, K. "Complete genome sequence and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecalis* EF-2001, a probiotic bacterium." **Genomics**, 113(3): 1534-1542. 2021.

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.

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.

Pereira, R.F., Cintra, L.T.A., Tessarin, G.W.L., Chiba, F.Y., de Lima Coutinho Mattered, M.S., Scaramele, N.F., Tsosura, T.V.S., Ervolino, E., de Oliveira, S.H.P. and Sumida, D.H. "Periapical Lesions Increase Macrophage Infiltration and Inflammatory Signaling in Muscle Tissue of Rats." **J Endod**, 43(6): 982-988. 2017.

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.

Quevedo, J., Vianna, M., Zanatta, M.S., Roesler, R., Izquierdo, I., Jerusalinsky, D. and Quillfeldt, J.A. "Involvement of mechanisms dependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the hippocampus but not in the caudate nucleus in memory." **Behav Pharmacol**, 8(8): 713-717. 1997.

Ran, S., Huang, J., Liu, B., Gu, S., Jiang, W. and Liang, J. "Enterococcus Faecalis activates NLRP3 inflammasomes leading to increased interleukin-1 beta secretion and pyroptosis of THP-1 macrophages." **Microb Pathog**, 154: 104761. 2021.

Ricucci, D. and Siqueira, J.F., Jr. "Anatomic and microbiologic challenges to achieving success with endodontic treatment: a case report." **J Endod**, 34(10): 1249-1254. 2008.

Ricucci, D. and Siqueira, J.F., Jr. "Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings." **J Endod**, 36(8): 1277-1288. 2010.

Ricucci, D., Siqueira, J.F., Jr., Abdelsayed, R.A., Lio, S.G. and Rôças, I.N. "Bacterial Invasion of Pulp Blood Vessels in Teeth with Symptomatic Irreversible Pulpitis." **J Endod**, 47(12): 1854-1864. 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.

Roesler, R., Schröder, N., Vianna, M.R., Quevedo, J., Bromberg, E., Kapczinski, F. and Ferreira, M.B. "Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats." **Brain Res**, 975(1-2): 207-213. 2003.

Sakaguchi, S., Mikami, N., Wing, J.B., Tanaka, A., Ichiyama, K. and Ohkura, N. "Regulatory T Cells and Human Disease." **Annu Rev Immunol**, 38: 541-566. 2020.

Sánchez-Domínguez, B., López-López, J., Jané-Salas, E., Castellanos-Cosano, L., Velasco-Ortega, E. and Segura-Egea, J.J. "Glycated hemoglobin levels and prevalence of apical periodontitis in type 2 diabetic patients." **J Endod**, 41(5): 601-606. 2015.

Scarpato, 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.

Sehirli, A., Aksoy, U., Kermeoglu, F., Kalender, A., Savtekin, G., Ozkayalar, H. and Sayiner, S. "Protective effect of alpha-lipoic acid against apical periodontitis-induced cardiac injury in rats." **Eur J Oral Sci**, 127(4): 333-339. 2019.

Silva, M.J., Sousa, L.M., Lara, V.P., Cardoso, F.P., Júnior, G.M., Totola, A.H., Caliari, M.V., Romero, O.B., Silva, G.A., Ribeiro-Sobrinho, A.P. and Vieira, L.Q. "The role of iNOS and PHOX in periapical bone resorption." **J Dent Res**, 90(4): 495-500. 2011.

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 $\beta$  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. "Diversity of endodontic microbiota revisited." **J Dent Res**, 88(11): 969-981. 2009.

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.

Siqueira, J.F., Rôças, I.N. and Ricucci, D.J.E.T. "Biofilms in endodontic infection." **Int Endod J**, 22(1): 33-49. 2010.

Sirin, D.A., Ozcelik, F., Ersahan, S. and Pence, H.H. "The importance of inflammatory biomarkers, IL-6 and PAPP-A, in the evaluation of asymptomatic apical periodontitis." **Odontology**, 109(1): 250-258. 2021.

Sochocka, M., Donskow-Łysoniewska, K., Diniz, B.S., Kurpas, D., Brzozowska, E. and Leszek, J. "The Gut Microbiome Alterations and Inflammation-Driven Pathogenesis of Alzheimer's Disease-a Critical Review." **Mol Neurobiol**, 56(3): 1841-1851. 2019.

Song, Y., Li, X., Huang, D. and Song, H. "Macrophages in periapical lesions: Potential roles and future directions." **Front Immunol**, 13: 949102. 2022.

Takahashi, K., Kurokawa, K., Hong, L., Miyagawa, K., Mochida-Saito, A., Iwasa, M., Iwasa, H., Nakagawasai, O., Tadano, T., Takeda, H. and Tsuji, M. "Antidepressant effects of *Enterococcus faecalis* 2001 through the regulation of prefrontal cortical myelination via the enhancement of CREB/BDNF and NF- $\kappa$ B p65/LIF/STAT3 pathways in olfactory bulbectomized mice." **J Psychiatr Res**, 148: 137-148. 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/ $\beta$ -catenin signaling attenuates periapical bone lesions." **J Dent Res**, 93(2): 175-182. 2014.

Tennert, C., Fuhrmann, M., Wittmer, A., Karygianni, L., Altenburger, M.J., Pelz, K., Hellwig, E. and Al-Ahmad, A. "New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings." **J Endod**, 40(5): 670-677. 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.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. and Telser, J. "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." **Int J Biochem Cell Biol**, 39(1): 44-84. 2007.

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.

Vengerfeldt, V., Mändar, R., Saag, M., Piir, A. and Kullisaar, T. "Oxidative stress in patients with endodontic pathologies." **J Pain Res**, 10: 2031-2040. 2017.

Vianna, M.R., Alonso, M., Viola, H., Quevedo, J., de Paris, F., Furman, M., de Stein, M.L., Medina, J.H. and Izquierdo, I. "Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat." **Learn Mem**, 7(5): 333-340. 2000.

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.

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., Jin, H., Ye, D., Wang, J., Ao, X., Dong, M. and Niu, W. "*Enterococcus faecalis* Lipoteichoic Acid-induced NLRP3 Inflammasome via the Activation of the Nuclear Factor Kappa B Pathway." **J Endod**, 42(7): 1093-1100. 2016.

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

Wang, Y., Andrukhov, O. and Rausch-Fan, X. "Oxidative Stress and Antioxidant System in Periodontitis." **Front Physiol**, 8: 910. 2017.

Weber, M., Schlittenbauer, T., Moebius, P., Büttner-Herold, M., Ries, J., Preidl, R., Geppert, C.I., Neukam, F.W. and Wehrhan, F. "Macrophage polarization differs between apical granulomas, radicular cysts, and dentigerous cysts." **Clin Oral Investig**, 22(1): 385-394. 2018.

Wen, Y.H., Lin, Y.X., Zhou, L., Lin, C. and Zhang, L. "The immune landscape in apical periodontitis: From mechanism to therapy." **Int Endod J**. 2024.

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 Investiq**, 26(12): 7157-7165. 2022.

Zahran, S., Witherden, E., Mannocci, F. and Koller, G. "Characterization of Root Canal Microbiota in Teeth Diagnosed with Irreversible Pulpitis." **J Endod**, 47(3): 415-423. 2021.

Zhang, C., Du, J. and Peng, Z. "Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review." **J Endod**, 41(8): 1207-1213. 2015.

Zhang, C., Yang, Z. and Hou, B. "Diverse bacterial profile in extraradicular biofilms and periradicular lesions associated with persistent apical periodontitis." **Int Endod J**, 54(9): 1425-1433. 2021.

Zhang, J., Huang, X., Lu, B., Zhang, C. and Cai, Z. "Can apical periodontitis affect serum levels of CRP, IL-2, and IL-6 as well as induce pathological changes in remote organs?" **Clin Oral Investiq**, 20(7): 1617-1624. 2016.

Zhang, Y., Guo, J. and Jia, R. "Treg: A Promising Immunotherapeutic Target in Oral Diseases." **Front Immunol**, 12: 667862. 2021.

Zheng, J., Wu, Z., Niu, K., Xie, Y., Hu, X., Fu, J., Tian, D., Fu, K., Zhao, B., Kong, W., Sun, C. and Wu, L. "Microbiome of Deep Dentinal Caries from Reversible Pulpitis to Irreversible Pulpitis." **J Endod**, 45(3): 302-309.e301. 2019.

## **ANEXOS**

## 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 **19/04/2022**.

<b>Título do projeto</b>	Avaliação da neuroinflamação e de parâmetros comportamentais em modelo de lesão periapical com Porphyromonas gingivalis e Enterococcus faecium em rato Wistar adultos.
<b>Project title</b>	Evaluation of neuroinflammation and behavioral parameters in a periapical lesion model with Porphyromonas gingivalis and Enterococcus faecium in adult Wistar rats.
<b>Número do protocolo Protocol number</b>	45/2021
<b>Pesquisador principal Principal Investigator</b>	Tatiana Barichello
<b>Pesquisadores Researchers</b>	Jaqueline da Silva Generoso, Allan Minatto Collodel, Karina Marcon, Soraia Netto, Daiane Soethe Coan, Atilio Silvestre Negro, Patricia Mendes Viana, Rafael da Silva de Moura, Samuel Brasil Stonoga, Elisa Tassi Mondardo, Renan Antonio Ceretta.
<b>Finalidade</b>	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	20/04/2022 a 19/04/2023
<b>Espécie/linhagem/raça</b>	Rato heterogênico/Wistar
<b>Idade/Peso</b>	60 dias / 250-300g
<b>Número de animais</b>	107 / masculino
<b>Procedência</b>	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](mailto:ceua@unesc.net).

*Josiane Budni*  
Josiane Budni

Coordenadora da CEUA

Criciúma-SC, 19 de abril de 2022

## ANEXO B – 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**.

<b>Título do projeto</b>	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.
<b>Project title</b>	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.
<b>Número do protocolo Protocol number</b>	37/2022
<b>Pesquisador principal Principal Investigator</b>	<b>Tatiana Barichello</b>
<b>Pesquisadores Researchers</b>	Jaqueline da Silva Generoso, Karina Marcon, Soraia Netto, Elisa Tassi Mondardo, Renan Antonio Ceretta, Diogo Dominguni, Daniel Paulo Bortoluzzi.
<b>Finalidade</b>	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	15/06/2022 a 15/06/2023
<b>Espécie/linhagem/raça</b>	Rato heterogênico / Wistar
<b>Idade/Peso</b>	60 dias / 250 – 300g
<b>Número de animais</b>	Feminino 324 e Masculino 162 = 486
<b>Procedência</b>	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](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma-SC, 14 de junho de 2022

Josiane Budni

Coordenadora da CEUA