

**KAREEN NICOLE ANDRADE SEPÚLVEDA**

**Influência da periodontite apical crônica no desenvolvimento de  
cardiomiopatia-induzida em ratos**

São Paulo

2020



**KAREEN NICOLE ANDRADE SEPÚLVEDA**

**Influência da periodontite apical crônica no desenvolvimento de  
cardiomiopatia-induzida em ratos**

**Versão Corrigida**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Dentística) para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação  
Serviço de Documentação Odontológica  
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Andrade-Sepúlveda, Kareen Nicole.

Influência da periodontite apical crônica no desenvolvimento de cardiomiopatia-induzida em ratos / Kareen Nicole Andrade Sepúlveda; orientador Manoel Eduardo de Lima Machado. -- São Paulo, 2020.

109 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Endodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Periodontite apical crônica. 2. Cardiomiopatias. 3. Infecção focal. I. Machado, Manoel Eduardo de Lima. II. Título.

Andrade Sepúlveda KN. Influência da periodontite apical crônica no desenvolvimento de cardiomiopatia-induzida em ratos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:16/06/2020

### **Banca Examinadora**

Prof(a). Dr(a). Victor Elias Arana-Chavez

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Carlos Alberto Adde

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Claudia Brizuela Cordero

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de Los Andes, Santiago do Chile.

Julgamento: Aprovado



Dedico este trabalho aos meus pais, Manuel e Jeanette, pelo amor incondicional e por me incentivar a ser cada dia melhor.

Aos meus avôs (*in memoriam*) Mamita Zuly e Tatita Osvaldo, por serem a luz que guia meus passos, por tudo o amor que sempre me deram.



## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus** por ser a guia do meu caminho, por me fazer acreditar que tudo é possível e por todas as oportunidades que tem me dado!

Aos meus pais, **Manuel** e **Jeanette**, por me permitirem sempre atingir meus sonhos, vocês sempre têm acreditado em mim e têm me apoiado incondicionalmente. Vocês me deram valores morais sólidos e a confiança suficiente para acreditar que não tem sonho suficientemente grande que seja impossível de conseguir, porque fazendo o bem, indo pela vida com honestidade e humildade, cada sonho sempre será possível! O que sou hoje é graças a vocês, à sua dedicação e amor. Só tenho palavras para agradecer, vocês são os melhores pais que um filho possa sonhar!

A minha família, **Tio Ale**, **Tio Henry**, **Tia Teresa**, obrigada por todo o amor e carinho e por me receber sempre com os braços abertos cada vez que eu voltava para o Chile. **Tia Rossy**, mesmo na distância, não faz ideia quão importante foi para mim, principalmente nos dias escuros, eu não teria entrado no mestrado se não fosse por seu apoio, obrigada tia! **Tatita Hector**, meu avô, sinto uma admiração profunda pelo senhor, um exemplo de fortaleza! Eu o amo muito!. Aos meus primos, **Kimberly** e **Christopher** por sempre estarem dispostos a me ajudar com minhas dúvidas no inglês.

À minha **Mamita Zuly** (*in memorian*), minha avó, e **Tatita Osvaldo** (*in memorian*), meu avô: meus anjos, sei que nunca me deixaram sozinha, o começo do mestrado foi difícil demais porque vocês tinham partido só uns dias antes, sei que me deram a mão e me ajudaram a chegar até aqui, que me cuidaram e me fizeram acreditar que um amor tão grande nunca vai morrer! Não tem dia em que não sinta saudade, eu amo vocês!



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer ao **Prof. Manoel Eduardo de Lima Machado** por ter me orientado durante meu mestrado, por todos os ensinamentos e por me motivar a ser sempre melhor profissional e melhor pessoa e também por me permitir participar do Projeto 32 e outras atividades da equipe de endodontia. Vim ao Brasil para estudar com o senhor e vou embora muito grata por todo o conhecimento que levo comigo. Foi uma honra ter sido sua aluna, muito obrigada.

Agradeço infinitamente a **Elis Chinen** e **Douglas Nesadal**, sem vocês não teria sido possível nada disto, eu vou ficar grata pelo resto da minha vida por tudo o que vocês me ajudaram e me ensinaram e pelo suporte que vocês me deram nos momentos difíceis. **Elis**, você me ensinou tudo o que eu precisava para conseguir trabalhar com meus ratinhos, me ensinando tudo com muita paciência e dedicação, além dos passos necessários na parte histológica. Obrigada também por cuidar dos meus filhinhos quando tive que ficar ausente por alguns dias. **Douglas**, você me ensinou tudo no laboratório da Bioquímica Oral, nunca esquecerei dos seus ensinamentos, desde a parte da coleta do material até a análise dos dados do espectrofotômetro, absolutamente tudo o que eu aprendi na bioquímica foi graças a você. Nunca poderia ter imaginado quanto eu ia crescer graças a tudo o que aprendi com vocês.

Ao **Prof. Victor Arana** por me abrir as portas do laboratório da Biologia Oral e do Biotério de experimentação animal para conseguir fazer minha pesquisa. Obrigada por sua ajuda e seus ensinamentos na parte histológica. Também ao **Prof. Fernando Nogueira** por me permitir trabalhar no laboratório da Bioquímica Oral e realizar os experimentos da minha pesquisa.

Aos professores da área da endodontia da FOU SP, **Carla Sipert, Maine Skelton, Celso Caldeira, Giulio Gavini, Ericka Pinheiro e Marcelo dos Santos**, por todos os conhecimentos e ensinamentos compartilhados. As aulas de vocês sempre foram de altíssima qualidade e ficarei sempre agradecida com Deus por me permitir entrar na USP e aprender de profissionais tão maravilhosos como vocês. **Prof. Maine**, obrigada por sempre estar preocupada por mim e pelo carinho e compreensão que

me deu cada vez que precisei de você. **Prof. Carla**, o que aprendi nas suas disciplinas foi uma parte fundamental para minha pesquisa e muitas das coisas que contou para nós me motivaram a fazer coisas diferentes, como quando me matriculei numa disciplina no INCOR que era para doutorandos em Cardiologia... obrigada professora.

Ao **Hector Caballero** por me ajudar sempre na minha pesquisa, chegando a ir me ajudar inclusive domingos de manhã no período das induções. Quando cheguei, 4 anos atrás, a gente nem se falava, mas graças ao mestrado ganhei um amigo. Lembre-se dos momentos compartilhados e das conversas e não esqueça que você tem um futuro brilhante pela frente. Ao **Ale Zolio** por fazer das quintas feiras dias “engraçados”, por todos os momentos compartilhados na liga de Endodontia, pelas risadas e pela sua forma maravilhosa de ver a vida sempre de um jeito positivo.

À **Giovanna Sarra**, obrigada amiga por sempre estar disposta a me ajudar, tanto nas aulas quanto com meus ratinhos, por cuidar deles com carinho e por me ajudar todo santo dia quando era para injetar, não importando se eram domingos ou feriados. Por nossas conversas que “só a gente ia entender” e pelo apoio que isso significou para mim.

À **Prof. Marcia Porto-Pires**, por ter sido uma professora incrível todos estes anos, me aconselhando sobre a endodontia e sobre a vida. Sempre disposta a me ajudar, sempre com um sorriso e me motivando a seguir em frente. Obrigada por tudo, obrigada por ter me dado as palavras certas no momento certo.

À **Andressa Beltrão**, minha melhor amiga desde que cheguei. Obrigada pela sua amizade incondicional, pelo apoio e suporte nos momentos difíceis e pela alegria de me mostrar e ensinar a cultura brasileira! E se eu consegui ser fluente no português é graças a você!

Ao **Juan Pablo**, por ter sido meu parceiro e companheiro durante meu mestrado, comemorando minhas conquistas e me dando o apoio e compreensão nos momentos difíceis.

Às amigas para a vida toda que a USP e APCD me deram, **Ju Ferreira, Raquel Guillén e Fátima Romero**, vocês foram um dos presentes que o Brasil me deu, obrigada pela amizade maravilhosa, por todos os momentos que ficarão para sempre no meu coração. Aos meus queridos amigos que o Projeto 32 me deu, **Gilmar e Diego Luna**, por essa amizade cheia de momentos inesquecíveis que levarei a vida toda.

À minhas amigas chilenas em São Paulo, **Ángela, Alejandra e Karin**. Obrigada pelas risadas, “las onces” e a companhia e compreensão que muitas vezes só quem mora longe de casa pode entender. **Ángela**, obrigada por toda sua ajuda na parte estatística do meu trabalho e por todos os momentos, abraços e companhia em momentos felizes e tristes e também pelos “carretes” brasileiros que a gente compartilhou.

Aos meus amigos do Mestrado em Endodontia/Dentística/Laser, **Bruna Gontijo, Raphael, Stephanie, Iandara, Caroline Hornik, Julio Queiroz, Juliane Tavares**, obrigada pela companhia de vocês nas disciplinas, almoços e por fazerem os momentos na faculdade mais felizes! **Bruna**, a gente sofreu, chorou, deu risadas, dançou e comemorou juntas, o tempo passou rápido demais, mas dou graças a Deus por ter entrado ao mesmo tempo no mestrado com você e ter se apoiado sempre. Obrigada pela sua amizade! **Rapha**, obrigada por todos os bons momentos, pelas conversas sinceras e por termos apoiado sempre! É incrivelmente bom ter ao nosso redor pessoas verdadeiras e sinceras, você virou um grande amigo. **Stephanie**, a gente se conheceu em algum momento bem no começo, mas sem perceber já éramos amigas! Obrigada por tudo, a vida louca no laboratório não permitiu compartilhar mais, mas sempre foi bom te encontrar no departamento, ainda por alguns minutos.

Ao **Marlus, Juliana Cristina e meninas da Biologia Oral**, obrigada por me aceitar não sendo do departamento de vocês, a convivência sempre foi tão maravilhosa que eu acabava ficando lá mesmo inclusive nos dias sem ter necessidade de estar no laboratório, me senti uma mais de vocês.

Ao **Cleber, Thais, Prof. Maeda, Prof Regina, Prof Soraya** por todos os momentos compartilhados na equipe do professor e pelos ensinamentos sobre a endodontia. **Prof. Soraya**, obrigada por sempre me receber com um sorriso e pelo carinho que sempre me deu! **Cleber**, obrigada pelos momentos compartilhados, por todos os ensinamentos e pelos sorvetes e doces após o Curso rsrs.

Aos meus amigos da vida inteira, incondicionais sempre, **Carlita, Cami Concha, Romi, Pablo, Tico, Martín**, nossa amizade é a prova de fronteiras!

À **Mahaila El Helwa**, por todas essas aulas incríveis, inesquecíveis que me ajudaram a achar a calma e paz tão importante para desenvolver minha pesquisa. E a minhas amigas que conheci lá, **Leslie e Isah**, já estou com saudade das nossas terças!

A todos os funcionários e técnicos da FOUSP, entre eles **Selma, Leandro, Sr. Aldo, Silvana, David, Glauci, Katia, Alessandra**, vocês são totalmente imprescindíveis para nós, obrigada por toda a ajuda!

"Cada sonho que você deixa para atrás é um pedaço do seu futuro que deixa de existir".

Steve Jobs



## RESUMO

Andrade-Sepúlveda KN. Influência da periodontite apical crônica no desenvolvimento de cardiomiopatia-induzida em ratos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão corrigida.

Estudos têm concluído que infecções dentais como periodontite apical (AP) podem potencializar a patogênese de doenças sistêmicas. A cardiomiopatia dilatada (CMD) é uma condição que afeta a função do miocárdio, dificultando que o coração funcione eficientemente como uma bomba. Existem estudos correlacionando as infecções endodônticas com doenças cardíacas, associando o papel do processo inflamatório e infeccioso endodôntico no desenvolvimento delas, mas não há estudos que avaliem a relação existente entre estas infecções com CMD. O objetivo do trabalho foi avaliar a influência da periodontite apical crônica no desenvolvimento de cardiomiopatia-induzida em ratos medindo o estresse oxidativo e a atividade das enzimas antioxidantes. Quarenta e dois ratos Wistar foram divididos em 4 grupos: Grupo Controle (C) (n=3): sem AP e sem cardiomiopatia-induzida; Grupo AP (n=10): com AP e sem cardiomiopatia-induzida; Grupo CM (n=12): sem AP e com cardiomiopatia-induzida; Grupo APCM (n=17): com AP e com cardiomiopatia-induzida. A AP foi obtida por meio da exposição pulpar dos molares maxilares à cavidade oral por 30 dias. Posteriormente, a CMD foi induzida seguindo a metodologia de O'Connell et al., (2017) usando a indução de "curto prazo". Os animais receberam Doxorrubicina (2,5mg/kg/dose) aplicada em 5 injeções intraperitoneais num período de 2 semanas (dose acumulativa total 12,5mg/kg), os animais do grupo controle e do grupo AP receberam solução salina (0,9% NaCl). Trinta dias após o início da indução da CMD, os animais foram eutanasiados por decapitação através de guilhotina. Para constatar a presença de lesão periapical, as maxilas foram removidas cirurgicamente, dissecadas, fixadas e desmineralizadas para posteriormente serem incluídas e preparadas para análise histológica sob microscopia ótica. Os corações foram coletados, pesados, e imediatamente armazenados para posteriormente realizar a análise bioquímica de peroxidação lipídica (MDA) e de atividade das enzimas antioxidantes (CAT, GPx e SOD). O teste

Shapiro-Wilk foi utilizado para determinar a normalidade das amostras; seguido do teste ANOVA de 1 fator com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni com um nível de significância de 5%. A peroxidação lipídica aumentou significativamente no grupo APCM com respeito a todos os outros grupos, seguido do grupo CM que teve diferença estatística somente com o grupo AP. No que se refere à enzima antioxidante, os menores valores de atividade foram obtidos no grupo APCM com diferença estatística ao grupo CM. Considerando que os níveis sistêmicos de citocinas e de estresse oxidativo são maiores na presença de AP, e que estes aumentam mais em casos de doenças sistêmicas, provavelmente uma disseminação metastática de produtos da inflamação estariam afetando o tecido miocárdico piorando as condições de CMD no grupo APCM refletindo-se pelo aumento da peroxidação lipídica. Os menores valores da atividade enzimática no grupo APCM pode ser devido a uma depleção nos níveis destas enzimas e/ou na inativação delas por causa de uma maior severidade do dano no miocárdio. Com base nos resultados, conclui-se que a periodontite apical crônica influencia no desenvolvimento de cardiomiopatia-induzida em ratos, através de um aumento do estresse oxidativo e alteração da atividade das enzimas antioxidantes no tecido ventricular.

Palavras-chave: Periodontite apical crônica. Cardiomiopatia. Infecção focal.

## ABSTRACT

Andrade-Sepúlveda KN. Influence of chronic apical periodontitis on the development of cardiomyopathy-induced in rats [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão corrigida.

Studies concluded that oral infections as apical periodontitis (AP) may enhance the pathogenesis of systemic diseases. Dilated cardiomyopathy (CMD) is a condition that affects cardiac muscle function disabling the heart to function efficiently as a pump. There are studies correlating endodontic infections with cardiac diseases, linking the role of the inflammatory and infectious endodontic process in their developing, but there are no studies assessing the relationship between these infections and CMD. The aim of this study was to determine if chronic apical periodontitis influences the development of cardiomyopathy-induced in rats, measuring oxidative stress and antioxidant enzymatic activities. 42 Wistar rats were divided into 4 groups: Control group (C) (n=3): without apical periodontitis and without cardiomyopathy-induced; AP group (n=10): with apical periodontitis and without cardiomyopathy-induced; CM group (n=12): without apical periodontitis and with cardiomyopathy-induced; APCM group (n=17): with apical periodontitis and with cardiomyopathy-induced. To induce AP, the pulps of maxillary molars were surgically exposed and were left opened to oral cavity for 30 days. CMD was induced according to O'Connell et al., (2017) methodology using a "short-term" induction model. After AP induction, i.e., after 30 days, animals received 5 intraperitoneal Doxorubicin injections (2.5mg/kg/dose) over a period of 2 weeks (total accumulative dose 12.5mg/kg), control and AP group animals received saline solution (0.9% NaCl) at the same schedule of administration. Body weight and toxicity signals were registered throughout all the experimental period. After 30 days from the beginning of the CMD induction, animals were euthanized by guillotine. To verify the presence of periapical lesion, jaws were surgically removed, dissected, fixed and demineralized to be then included and prepared to histological analysis under optical microscopy. Hearts were collected, weighed and immediately stored to then perform biochemical analysis of lipid peroxidation (MDA) and antioxidant enzymatic activities (CAT, GPx and SOD). Data

was subjected to Shapiro-Wilk test to assess normality and then to one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test, with a significance level of 5%. Lipid peroxidation was significantly higher in the APCM group than all other groups, followed by the CM group that had statistical difference only from the AP group. The lower value in antioxidant enzymatic activities was obtained in APCM group with statistical difference with respect to the CM group. Whereas systemic levels of cytokines and oxidative stress are higher in presence of AP and they further increase in systemic disease cases, likely a metastatic dissemination of inflammation products would be affecting myocardial tissue worsening CMD conditions in the APCM group, as lipid peroxidation enhance shows. Lower values of antioxidant enzymatic activity in APCM group would be probably due to a depletion of enzymes levels and/or their inactivation due to a higher severity of myocardial injury in this group. According to the results obtained, it was concluded that chronic apical periodontitis influences the development of cardiomyopathy-induced in rats, enhancing oxidative stress and altering antioxidant enzymatic activities in ventricular tissue.

Keywords: Chronic apical periodontitis. Cardiomyopathy. Focal infection.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - Campo operatório, instrumental cirúrgico, mesa cirúrgica, motor .....	64
Figura 4.2 - Rato anestesiado e sedado posicionado ventralmente na mesa cirúrgica no ato da indução da periodontite apical crônica.....	65
Figura 4.3 - Exposição pulpar no primeiro e segundo molar superior direito .....	66
Figura 4.4 - Cloridrato de Doxorrubicina utilizado na indução da cardiomiopatia. ....	67
Figura 4.5 - Microfotografia representativa de um espécime do grupo AP .....	69
Figura 4.6 - Microfotografia representativa de um espécime do grupo AP .....	70
Figura 4.7 - Microfotografia representativa de um espécime do grupo APCM .....	71
Figura 4.8 - Microfotografia representativa de outro espécime do grupo APCM .....	72
Figura 5.1 - Curvas de sobrevivência por grupo .....	78
Figura 5.2 - Comportamento do peso corporal por grupo. ....	80



## LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Quantidade e taxa de mortalidade por grupo .....	77
Tabela 5.2- Peso médio dos animais por grupo .....	81
Tabela 5.3- Diferença de peso dos animais por grupo.....	81
Tabela 5.4- Peso dos corações por grupo .....	83
Tabela 5.5 - Biomarcadores de estresse oxidativo .....	85



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	periodontite apical
AMI	infarto agudo ao miocárdio
BHT	hidroxi-butil-tolueno
CAT	catalase
CEUA	Comissão de Ética de Uso de Animais
CMD	cardiomiopatia dilatada
CV	cardiovascular
DAC	doença arterial coronariana
DEA	dietanolamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	cloridrato de doxorubicina
DP	doença periodontal
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GPx	glutathione peroxidase
IC	insuficiência cardíaca
IL	interleucina
IG	imunoglobulina
LPS	lipopolissacarídeo
MDA	malonaldeído
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MnCl <sub>2</sub>	cloreto de manganês
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaOCl	hipoclorito de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
nm	nanômetro
PQC	preparo químico-cirúrgico
PCR	proteína C-reativa

ROS	espécies reativas de oxigênio
Rpm	rotações por minuto
SCR	sistema de canais radiculares
SOD	superóxido dismutase
TBARS	ácido tiobarbitúrico
TE	tratamento endodôntico
TEA	trietanolamina

## LISTA DE SIMBOLOS

#	número
%	por cento
°C	graus celsius
μl	microlitro
<	menor
>	maior
≥	maior ou igual que
≤	menor ou igual que



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	29
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	31
2.1	ASSOCIAÇÃO DOENÇAS DO SISTEMA CARDIOVASCULAR E SAUDE BUCAL.....	31
2.2	ASSOCIAÇÃO INFECÇÕES ENDODÔNTICAS E DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	44
2.3	MODELO DE INDUÇÃO DE CARDIOMIOPATIA POR DOXORRUBICINA.....	49
2.4	MODELO DE INDUÇÃO DA PERIODONTITE APICAL CRÔNICA.....	55
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO</b> .....	61
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	63
4.1	DESENHO EXPERIMENTAL.....	63
4.2	INDUÇÃO DA PERIODONTITE APICAL CRÔNICA.....	64
4.3	INDUÇÃO DA CARDIOMIOPATIA POR DOXORRUBICINA.....	67
4.4	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICO.....	68
4.5	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	73
4.5.1	<b>Determinação da peroxidação lipídica</b> .....	73
4.5.2	<b>Determinação da atividade da Catalase</b> .....	74
4.5.3	<b>Determinação da atividade da Superóxido dismutase</b> .....	74
4.5.4	<b>Determinação da atividade da Glutathione Peroxidase</b> .....	74
4.5.5	<b>Determinação da concentração de proteína total</b> .....	75
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	77
5.1	DADOS GERAIS.....	77
5.1.1	<b>Número de animais, taxa de mortalidade e sobrevivência</b> .....	77
5.1.2	<b>Peso corporal dos animais</b> .....	79
5.1.3	<b>Alteração da atividade motora</b> .....	82
5.1.4	<b>Peso dos corações</b> .....	83
5.2	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	84
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	87
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	99
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	101
	<b>ANEXO</b> .....	109



## 1 INTRODUÇÃO

A teoria da infecção focal, proposta no começo do século 20, sugere que microrganismos patógenos associados a infecções dentais podem se disseminar pelo organismo e desencadear alterações sistêmicas. Abordagens nos últimos anos têm concluído que infecções dentais como periodontite apical (AP) podem promover patologias sistêmicas, principalmente aumentando o número de infiltrado de células inflamatórias e níveis de citocinas.

As duas maiores doenças infecciosas dentais são as periodontais e as endodônticas. Evidências epidemiológicas sugerem uma associação entre doença periodontal e doenças cardiovasculares. Ainda que os perfis microbianos e inflamatórios entre ambas doenças sejam semelhantes, poucos estudos têm estabelecido relações sólidas entre AP e doenças cardiovasculares, e os que existem são inconsistentes.

Entre as doenças cardiovasculares, está a insuficiência cardíaca (IC), definida como a incapacidade do coração para bombear adequadamente o sangue para atingir as necessidades do metabolismo tissular ou quando bombeia a um volume ventricular diastólico anormalmente elevado. As causas da IC podem ter várias etiologias, entre elas, a cardiomiopatia ou miocardiopatia.

A cardiomiopatia é uma condição que afeta a função do músculo cardíaco que inabilita o coração funcionar eficientemente como uma bomba. Ela pode ser genética ou adquirida, primária (efeitos diretos no miocárdio) ou secundária (patologia multiorgânica). A cardiomiopatia apresenta 3 diferentes formas funcionais clínico-patológicas: miocardiopatia dilatada, miocardiopatia hipertrófica e miocardiopatia restritiva. A miocardiopatia dilatada é a forma mais prevalente das miocardiopatias (aproximadamente 90%) e a restritiva a menos prevalente. Provavelmente são resultados finais de uma lesão miocárdica causada por muitos agentes tóxicos, metabólicos e infecciosos, doenças neuromusculares ou doenças imunológicas. Vários agentes farmacológicos tóxicos podem lesar o miocárdio

causando miocardite ou lesões crônicas como miocardiopatia idiopática dilatada. Entre esses agentes está a doxorubicina.

A doxorubicina (também chamada adriamicina) é um dos agentes antineoplásicos mais efetivos no tratamento de tumores malignos, é uma antraciclina com um amplo espectro de ação, mas seu uso é limitado porque apresenta efeitos cardiotóxicos.

Uma lesão endodôntica, referida frequentemente como periodontite apical, é uma infecção endodôntica polimicrobiana que resulta na destruição de tecido perirradicular. A invasão bacteriana e as defesas periapicais atingem comumente um equilíbrio resultando em uma lesão endodôntica estabelecida. A prevalência da AP é alta, aproximadamente 2 dentes por paciente apresentam tratamento endodôntico e 1 dente apresenta AP. O tratamento é a eliminação químico-cirúrgica da infecção endodôntica. Sabendo-se que nenhum sistema de instrumentação utilizado no tratamento endodôntico consegue um canal totalmente livre de microrganismos, é necessária uma combinação do preparo cirúrgico com desinfetantes químicos para reduzir a contagem de microrganismos que desenvolveriam uma periodontite apical, e para que assim, aqueles que remanesceram, não encontrem condições para o seu crescimento ou desenvolvimento. Lembrando estes microrganismos também se encontram dentro dos túbulos dentinários, canais laterais, ístmos e irregularidades. A presença de microrganismos dentro do canal é o principal motivo da perpetuação da infecção endodôntica, e com isso, a perpetuação do processo inflamatório.

Existem abordagens correlacionando as infecções endodônticas com aterosclerose e outras doenças cardíacas, associando o papel do processo inflamatório e infeccioso de origem endodôntica no desenvolvimento destas doenças, mas até o momento não há estudos que avaliem a relação existente entre estas infecções com cardiomiopatias.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

As doenças cardiovasculares (CV) são uma epidemia global responsável por aproximadamente 30% das mortes no mundo inteiro, sendo a maior de todas as causas de mortalidade. Enquanto as taxas de mortalidade das doenças CV têm diminuído bastante nos países do primeiro mundo, os fatores de risco, incluindo hipertensão, obesidade e diabetes, têm aumentado mundialmente. Tudo isto leva a uma morbidade aumentada provavelmente também devido ao envelhecimento da população (Schnall et al., 2016, Précoma et al., 2019).

### 2.1 ASSOCIAÇÃO DOENÇAS DO SISTEMA CARDIOVASCULAR E SAUDE BUCAL

Miller (1891) citou a cavidade oral como um reservatório de diversos germes patógenos que causam várias doenças no corpo, muitas delas com aparente origem desconhecida, embora, a origem muitas vezes seria na cavidade oral.

Hunter (1900) descreveu que as infecções purulentas do organismo podem invadir outras regiões quando as barreiras têm sua resistência diminuída ou os microrganismos estão em grande quantidade, incluindo as infecções orais que não ficam restritas à cavidade oral.

Billings (1912) descreve vários locais que podem ser fontes de infecções focais, tais como abscessos gengivais, alveolite, infecções nas cavidades paranasais, entre outras, e que podem causar doenças tais como artrite crônica, nefrite, degenerações CV, etc.

Ehrmann (1972) relatou que até aquela data não havia evidências científicas para apoiar a teoria da "infecção focal" no que diz respeito aos dentes. Embora toda a sepsé oral devia ser removida, não era recomendável prometer aos pacientes a

cura de doenças crônicas de origem obscura como resultado da remoção de tais focos. Inclusive a visão tradicional de que a taxa de recorrência da endocardite bacteriana subaguda é menor em pacientes desdentados estava sendo questionada naquela época.

Rogers (1976) na sua publicação expõe que algumas espécies estreptocócicas que tinham a boca como único habitat conhecido foram associadas à endocardite bacteriana subaguda e, portanto, a cavidade oral poderia servir como reservatório para pelo menos um tipo de infecção focal. No entanto, o papel das bactérias orais em outros tipos de infecção focal era desconhecido.

Overholser et al. (1988) avaliaram o desenvolvimento de endocardite bacteriana após extração dentária em ratos com doença periodontal. A doença periodontal foi induzida por 10 e 14 semanas mediante ligaduras de seda ao redor dos primeiros molares superiores e com dieta rica em sacarose. As vegetações valvares aórticas foram produzidas por meio de cateter transaórtico e, 24 horas depois, os molares superiores foram extraídos, sendo os animais eutanasiados 72 horas após as extrações. Dependendo se a indução da periodontite foi de 10 ou 14 semanas, as extrações resultaram em uma incidência de endocardite bacteriana de 24% e 50%, respectivamente. Os resultados mostraram uma tendência ao aumento da incidência de endocardite com o aumento da gravidade da doença periodontal.

Os fatores de risco conhecidos para doença arterial coronariana (DAC) não explicam todas as características clínicas e epidemiológicas da doença. Para analisar o papel das infecções bacterianas crônicas como fatores de risco para a doença, Mattila et al. (1989) investigaram a associação entre problemas de saúde bucal e infarto agudo do miocárdio (AMI) através de 2 estudos de casos e controles. Selecionaram 100 pacientes com AMI e 102 controles. A saúde oral foi avaliada usando escores de acordo com a severidade da doença periodontal e análise radiográfica. Com base nisso, a condição dental foi significativamente pior em pacientes com AMI do que nos controles. A associação permaneceu válida após o ajuste para idade, classe social, tabagismo, concentrações séricas de lipídios e presença de diabetes. Segundo os autores, estudos prospectivos adicionais são

necessários em diferentes populações para confirmar a associação e elucidar sua natureza.

Em consequência de vários estudos terem sugerido que infecções dentárias estarem associadas à DAC, Mattila et al. (1995) realizaram um estudo prospectivo de 7 anos de acompanhamento de 214 indivíduos com DAC (182 homens e 32 mulheres; idade média de 49 anos) que foram submetidos a exame oral e avaliação de fatores de risco clássicos coronários. Os principais desfechos foram a incidência de eventos coronarianos fatais e não fatais e a mortalidade geral. Cinquenta e dois pacientes preencheram os desfechos durante o acompanhamento. A saúde oral foi um preditivo significativo de eventos coronarianos quando controlada pelos seguintes fatores: idade, sexo, status socioeconômico, tabagismo, hipertensão, número de infartos do miocárdio anteriores, diabetes, índice de massa corporal e lipídios séricos. Os resultados suportam a hipótese de que infecções dentárias são um fator de risco para eventos coronarianos.

Diante da relação entre a severidade da doença periodontal e o risco de DAC e AMI, Beck et al. (1996) pensaram na hipótese de que essa relação é devida a mecanismos inflamatórios subjacentes que levam ao indivíduo a ter um alto risco de desenvolver doença periodontal e aterosclerose. Eles sugeriram que quando a doença periodontal é estabelecida, há uma carga biológica de endotoxinas e citocinas inflamatórias ( $\text{TxA}_2$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{PGE}_2$  e  $\text{TNF-}\alpha$ ) que iniciam ou exacerbam os eventos aterogênicos e tromboembólicos. Para isso fizeram um estudo incluindo 1147 homens nos quais foram medidas a perda de sustentação óssea e a profundidade de sondagem por dente. Os níveis de perda óssea e a incidência de DAC indicaram um gradiente biológico entre a severidade da exposição e a ocorrência da doença.

Newman (1996) reintroduziu o conceito de infecção focal numa revisão onde expõe alguns aspectos tais como: a) a infecção focal de origem dental pode derivar de lugares abertos (caries, bolsas periodontais, alvéolos após exodontia) ou fechados (infecção ao redor de raízes, dentes semi-incluídos infetados, polpas infetadas), e se espalhar (microrganismos ou seus produtos) diretamente nos

tecidos através dos planos faciais, cavidades ósseas, vasos sanguíneos ou linfáticos, nervos ou superfícies mucosas das glândulas salivares; b) Pacientes mais susceptíveis são todos os imunocomprometidos ou com doenças sistêmicas preexistentes; c) Os tecidos alvos incluem aqueles da cabeça e pescoço (infecção direta chegando inclusive ao mediastino, sinusites, infecções do espaço ocular, fascíte, abscessos craniais), articulações protéticas, marca-passos cardíacos, sistema respiratório (abscessos pulmonares, pneumonia), sistema CV (endocardite infecciosa, tromboflebite, AMI, DAC), sistema gastrointestinal e inclusive influenciar negativamente na gravidez, baixo peso ao nascer e parto prematuro.

Em uma revisão, Beck et al. (1998) avaliaram a relação entre doenças orais e DAC/aterosclerose, buscando determinar se periodontite é um fator de risco para essas doenças. Para isso, os autores analisaram 3 estudos de casos clínicos e 5 estudos longitudinais, onde, de acordo com os resultados, observaram que a extensão da infecção periodontal (carga microbiana) também está relacionada ao aparecimento de novos eventos da DAC; uma resposta inflamatória mais intensa ao LPS, como em infecções periodontais, pode promover a formação de ateroma e eventos tromboembólicos. Concluiu-se que a evidência disponível permite interpretar que a periodontite é um fator de risco para a aterosclerose e DAC.

Na revisão feita por Gendron et al. (2000), é mencionado que alguns procedimentos odontológicos e infecções orais podem provocar a introdução de microrganismos orais na corrente sanguínea ou no sistema linfático. A subsequente ligação e multiplicação dessas bactérias nos tecidos ou órgãos pode levar a infecções orais focais. Elas podem permanecer em seu local oral inicial, mas as toxinas liberadas podem atingir um órgão ou tecido via corrente sanguínea e causar lesão metastática. A inflamação metastática pode resultar de uma lesão imunológica causada por bactérias orais ou seus produtos solúveis que entram na corrente sanguínea e reagem com anticorpos específicos circulantes para formar complexos macromoleculares.

Devido a periodontite ter sido considerada como fator que pode afetar o curso e a patogênese de várias doenças sistêmicas, Li et al. (2000) fizeram uma revisão para avaliar o status atual das infecções orais, principalmente a periodontite,

como fator causal de doenças sistêmicas. Três mecanismos ou vias que ligam infecções orais a efeitos sistêmicos secundários foram propostos: (i) disseminação metastática da infecção oral como resultado de bacteremia transitória; (ii) lesão metastática pelos efeitos das toxinas microbianas orais circulantes; e (iii) inflamação metastática causada por lesão imunológica induzida por microrganismos orais. A periodontite pode afetar a suscetibilidade do hospedeiro à doença sistêmica de 3 maneiras: por fatores de risco compartilhados; biofilmes subgengivais que atuam como reservatórios de bactérias gram-negativas; e o periodonto atuando como reservatório de mediadores inflamatórios.

A doença periodontal também tem sido associada com o acidente vascular encefálico (AVE) e aterosclerose subclínica. Diante disto, Engebretson et al. (2005) buscaram determinar se a avaliação radiográfica da doença periodontal está associada com a placa da artéria carótida não-estenótica como medida ultrassonográfica da aterosclerose subclínica. Radiografias panorâmicas foram feitas em 203 pacientes (54-96 anos) sem histórico de AVE, seguido de ultrassom carotídeo de alta resolução para observar a prevalência e espessura de placa carotídea. Entre os pacientes dentados com perda óssea severa, a média da espessura da placa carotídea foi significativamente maior, esta espessura aumentou com a severidade da perda óssea. Este aparente efeito de dose-resposta foi mais evidente entre os não fumantes. Concluíram que a perda óssea periodontal severa está associada independentemente com a aterosclerose carotídea.

Mattila et al. (2005) fizeram uma revisão da literatura para verificar a evidência de que as infecções crônicas, como a periodontite, estejam associadas a um elevado risco de doenças CV. Os autores encontraram que os mecanismos desta associação são desconhecidos. Os patógenos orais têm causado aterosclerose em animais de experimentação e têm sido encontrados em lesões ateroscleróticas humanas. A periodontite também induz resposta inflamatória e imune periférica, refletida em elevadas concentrações de proteína C-reativa e anticorpos IgA contra patógenos periodontais. A prevalência de doenças CV parece ser maior naqueles indivíduos nos quais a periodontite coexiste com elevados níveis de proteína C-reativa. Isto pode indicar que a periodontite é um fator de risco para

doenças CV em indivíduos que reagem contra a infecção com uma resposta imune e inflamatória sistêmica. Isto pode ser devido a razões gênicas e também se aplica a outras infecções de baixo-grau.

Devido à evidência crescente de que a inflamação/infecção crônica seja fator de risco aterosclerótico, Soder et al. (2005) avaliaram o papel da doença periodontal no desenvolvimento de lesões vasculares ateroscleróticas iniciais. Oitenta e dois pacientes com doença periodontal e 31 pacientes saudáveis foram submetidos a exames orais, e 16 anos depois, foram feitas análises de fator de risco aterosclerótico e ultrassonografia carotídea: espessura da camada íntima-media da artéria carótida (IMT) e diâmetro do lúmen foram medidos e a área íntima-media (cIMA) foi calculada. Variáveis dependentes foram a relação entre IMT e cIMA e como independentes doença periodontal, idade, gênero, índice de massa corporal, hereditariedade para aterosclerose, diabetes mellitus, hipertensão, colesterol plasmático e tabagismo. Os valores médios para IMT e cIMA foram significativamente mais altos em pacientes com doença periodontal que nos controles, e a doença periodontal foi o principal preditivo independente da cIMA e IMT. Os resultados indicam que a doença periodontal está associada com o desenvolvimento de lesões ateroscleróticas carotídeas iniciais.

Oikarinen et al. (2009) investigaram a associação entre DAC e várias doenças infecciosas dentais detectáveis radiograficamente num estudo prospectivo de casos clínicos. Oitenta e oito pacientes com um primeiro ataque de angina instável ou AMI participaram do estudo como casos e foram correspondidos de acordo com a idade, gênero e nacionalidade com pacientes controle que não apresentavam DAC. A severidade e extensão da perda óssea periodontal e outros sinais radiográficos de infecção foram analisados com ortopantomografias. Casos de cardiopatia tiveram mais dentes com necessidade de exodontia, lesões periapicais, molares com lesões de furca, dentes com perda óssea marginal severa e dentes com perda óssea vertical do que os casos de controle. Os autores puderam concluir que houve uma associação significativa entre doenças orais e DAC, porém estes resultados não devem ser considerados como indicadores de relação causal, especialmente porque os diagnósticos foram feitos somente por exame radiográfico,

e que o impacto real das infecções orais no DAC deve ser examinado num estudo clínico prospectivo.

Vários fatores de risco como pressão arterial elevada, diabetes, tabagismo e hábitos alcoólicos, predisposição gênica e inflamação crônica devem ser considerados em pacientes com doenças CV. Willershausen et al. (2009) investigaram se existe uma correlação entre infecções de origem dental e a presença AMI. Cento e vinte e cinco pacientes com antecedentes de AMI e 125 pacientes sadios participaram do estudo. Número de dentes, dentes tratados endodônticamente, índice periodontal (PSI), nível de inserção clínico e avaliação radiográfica apical foram registrados. A avaliação médica consistiu em glicemia, proteína C-reativa (PCR) sérica e número de leucócitos. Os pacientes com AMI mostraram uma saúde dental desfavorável com maior número de dentes perdidos, menos dentes com tratamento endodôntico, maior número de lesões apicais e maior índice PSI quando comparados aos pacientes sem AMI. Os dados médicos mostraram uma correlação não significativa entre PCR e o número de lesões apicais. Como conclusão, o estudo mostrou evidência de que pacientes com antecedentes de AMI também apresentam uma condição dental desfavorável quando comparados com pacientes sadios e sugere uma associação entre infecções orais crônicas e infarto ao miocárdio.

Pizzo et al. (2010) descreveram a evolução da teoria da infecção focal até a fisiopatologia atual da doença periodontal e realizaram uma atualização sobre as relações entre periodontite crônica e doenças sistêmicas. Segundo os autores, durante as últimas décadas a relação entre odontologia e medicina interna, e especialmente o conceito da chamada teoria da infecção focal, tem sido amplamente debatido. A patogênese das doenças focais tem sido classicamente atribuída às patologias pulpare e infecções periapicais. Não obstante, nos anos recentes, o papel tem sido descartado, enquanto o interesse crescente é dedicado às possíveis associações entre infecção periodontal e doenças sistêmicas. De fato, patógenos periodontais e seus produtos, assim como mediadores inflamatórios produzidos nos tecidos periodontais podem entrar na corrente sanguínea causando efeitos sistêmicos e/ou contribuindo às doenças sistêmicas. Baseado neste mecanismo, a

periodontite crônica tem sido sugerida como um fator de risco para doenças CV associadas com aterosclerose, endocardite bacteriana, diabetes mellitus, entre outras. Várias hipóteses, incluindo susceptibilidade comum, inflamação sistêmica, infecção bacteriana direta e reatividade cruzada ou mimetismo molecular, entre antígenos bacterianos e antígenos próprios, têm sido postulados para explicar essas relações. Nesse cenário, a associação da doença periodontal com doenças sistêmicas preparou o terreno para a introdução do conceito de medicina periodontal.

Considerando que a inflamação está implicada na etiopatogenia da fibrilação atrial e que a periodontite causa uma resposta inflamatória sistêmica, Yu et al. (2010) avaliaram se este tipo de inflamação influencia a fibrilação atrial. Utilizaram 22 cães nos quais foi induzida a periodontite marginal por ligação (grupo periodontite) e 10 cães saudáveis controles. Antes da ligação e 30, 60 e 90 dias após o procedimento, foi feita uma avaliação eletrofisiológica para medir a refratariedade atrial e a induzibilidade da FA. Antes desta avaliação, foi coletado sangue para determinar os níveis de proteína C-reativa (PCR) e TNF- $\alpha$ . Os animais foram sacrificados após 90 dias, os corações e mandíbulas foram coletados para estudos morfológicos e quantificação da severidade da doença periodontal. O período refratário foi mais curto e a induzibilidade da FA aumentou progressivamente no grupo com periodontite. O aumento da PCR e TNF- $\alpha$  foi depois de 60 dias. Células inflamatórias foram encontradas mais no átrio do grupo com periodontite. Miólise afetou alguns cardiomiócitos atriais dos animais com periodontite. Os autores concluíram que a periodontite levou a uma resposta inflamatória no miocárdio atrial, o que perturbou as propriedades estruturais e eletrofisiológicas do átrio e facilitou a FA.

Bansal et al. (2013) fizeram uma revisão descrevendo como a medicina e odontologia se interconectam em vários níveis. Por exemplo, a teoria da infecção focal, popular no início de 1900, sugeriu que doenças sistêmicas pudessem ser atribuídas a infecções dentárias que naquela época eram comuns, crônicas e muitas vezes não tratadas. Com o advento do tratamento médico e odontológico moderno, particularmente antibióticos, esta relação foi esquecida. A descoberta de relações entre doença periodontal e doenças cardíacas, saúde bucal materna e parto

premature, interrelações bidirecionais entre diabetes e doenças periodontais, relação de infecções orais e doenças respiratórias crônicas e relação entre densidade mineral óssea esquelética e infecções orais, trouxe uma mudança de perspectiva. A pesquisa está agora focada no potencial impacto das doenças periodontais na saúde sistêmica. Assim, o impacto da infecção bucal na saúde sistêmica define um novo ramo na Periodontologia denominado medicina periodontal.

Schenkein e Loos (2013) fizeram uma revisão sobre os mecanismos inflamatórios que vinculam as doenças periodontais às doenças CV. Estudos implicam possíveis mecanismos que podem ser responsáveis das respostas inflamatórias aumentadas nas lesões ateromatosas devido a infecções periodontais. Eles incluem níveis aumentados de mediadores inflamatórios sistêmicos estimulados pelas bactérias e seus produtos a sítios distantes da cavidade oral, marcadores hemostáticos e trombóticos elevados que promovem um status pró-trombótico e inflamatório, anticorpos, anticorpos sistêmicos de reatividade cruzada que promovem inflamação e interagem com o ateroma, promoção de dislipidemia com o consequente aumento de lipídeos pró-inflamatórios, e fatores de susceptibilidade genética presentes em ambas as doenças levando a respostas inflamatórias aumentadas. Esses mecanismos podem atuar juntos para aumentar a inflamação sistêmica na doença periodontal e promover exacerbação da aterosclerose, embora faltem provas do aumento da inflamação sistêmica atribuível à periodontite que possa impactar na resposta inflamatória durante o desenvolvimento do ateroma, eventos trombóticos ou infarto ao miocárdio ou AVE.

Os patógenos periodontais exercem efeitos sistêmicos pela via hematogênica. A evidência sugere que a infecção periodontal pode induzir uma inflamação sistêmica de baixo grau. Gurav (2014) fez uma revisão para analisar a fisiopatologia da disfunção endotelial a respeito da infecção periodontal e ressaltar a associação entre estas doenças. De acordo com os estudos revisados, a periodontite altera a resposta vascular, aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão induzindo disfunção endotelial vascular. A terapia periodontal pode melhorar a função endotelial vascular perturbada.

Leong et al. (2014) fizeram uma revisão para examinar a literatura existente sobre a relação entre periodontite e hipertensão assim como para explorar as possíveis vias biológicas subjacentes que vinculam estas doenças. Hipertensão é um dos maiores fatores de risco para doenças CV. O estresse oxidativo e a disfunção endotelial estão dentre os componentes críticos do desenvolvimento da hipertensão. A inflamação tem recebido muita atenção e pode contribuir para um papel central na hipertensão. A periodontite é vinculada à disfunção endotelial, com elevação da pressão sanguínea e aumentado risco de mortalidade em pacientes hipertensos. Os marcadores inflamatórios estão aumentados em pacientes hipertensos com periodontite. Ao longo dos anos, vários estudos têm sido realizados para avaliar o grau de envolvimento da periodontite na iniciação e progressão da hipertensão. Vários estudos transversais documentam esta associação, embora sejam necessários estudos prospectivos mais bem desenhados para descobrir o real papel da periodontite na hipertensão.

Aarabi et al. (2015) fizeram uma revisão tomando em consideração a evidência do nível de proteína C-reativa associado ao risco de aterosclerose de 10 anos, sugerindo a presença de inflamação sistêmica provavelmente muito antes da presença desta doença. Dados mostram que a aterosclerose e doença periodontal interagem entre elas mediante liberação sistêmica de citocinas pró e anti-inflamatórias. Além disso, os patógenos periodontais foram identificados dentro das lesões ateroscleróticas e trombos isolados de pacientes com AMI. Finalmente, existe evidência crescente para fatores de susceptibilidade genética envolvidos em ambas das doenças. Estes achados suportam pontos em comum ao respeito de mecanismos patogênicos envolvidos em ambas as doenças inflamatórias. Inversamente, uma relação causal não pode ser ainda concluída na ausência de dados de estudos controlados randomizados

A cavidade oral possui diversas populações bacterianas e pode atuar como um local de origem para espalhar microrganismos patogênicos a diferentes locais do corpo, particularmente em pacientes imunocomprometidos e idosos. Nagpal et al. (2015) fizeram uma revisão na tentativa de resumir os diversos mecanismos que conectam as doenças periodontais e sistêmicas. A literatura tem defendido que pacientes com doença periodontal são mais susceptíveis a endotoxemia metabólica,

inflamação, diabetes tipo 2 e outras complicações sistêmicas, concluindo que as doenças periodontais podem ser fatores de risco que contribuem potencialmente a uma ampla variedade de doenças sistêmicas. Embora haja o aumento significativo na prevalência de infecções periodontais e doenças sistêmicas nas décadas passadas, os mecanismos biológicos que vinculam estas doenças não estão completamente explicados ainda. Consequentemente, os mecanismos em que estes danos bidirecionais ocorrem estão sendo explorados numa visão que permita desenvolver estratégias para prevenir ou controlar as complicações destas doenças.

Embora tem sido apresentado que pacientes com periodontite possuam risco maior de doenças CV, a relação causal entre estas condições ainda não é bem entendida. Neste particular, a rigidez arterial é considerada um marcador da aterosclerose e um fator de risco CV. Schmitt et al. (2015) fizeram uma revisão sistemática de estudos clínicos para responder as seguintes perguntas: os pacientes com periodontite têm rigidez arterial prejudicada quando comparado com pacientes sem periodontite? O tratamento periodontal é efetivo para melhorar a rigidez arterial em pacientes com periodontite? Por meio de 10 estudos eles observaram que pacientes com periodontite tinham uma maior rigidez arterial quando comparados com os pacientes controle. Os 2 estudos intervencionais mostraram resultados contraditórios ao respeito ao efeito do tratamento periodontal. Portanto, os pacientes com periodontite parecem ter uma maior rigidez arterial. O efeito do tratamento periodontal permanece pouco claro.

Ribeiro et al. (2016) fizeram um estudo transversal para avaliar a associação entre infecções dentais e doenças sistêmicas na população indígena do Brasil. A relação entre diabetes, hipertensão e obesidade com cárie e doença periodontal avançada foi avaliada em 225 pacientes. A cárie dental foi associada à hipertensão, e indivíduos com doença periodontal avançada tiveram uma maior pressão arterial sistólica que os indivíduos sem doença periodontal. Portanto, as infecções dentais foram associadas com hipertensão na população estudada.

Taquiarritmia e bradiarritmia são desordens do ritmo cardíaco. Pacientes com periodontite possuem alto risco de doenças CV, mas existe pouca informação

sobre a causalidade com as alterações do ritmo cardíaco. Aoyama et al. (2017) avaliaram a relação entre as infecções periodontais e taquiarritmias e bradiarritmias. Os pacientes portadores destas alterações cardíacas foram submetidos a exames periodontais e sanguíneos, além da avaliação de bactérias periodontopáticas na saliva. *P. gingivalis* e *Prevotella intermedia* foram altamente detectadas em pacientes com taquiarritmia comparados com os com bradiarritmia. A taxa de hipertensão e dislipidemia foram comparáveis entre os 2 grupos. Os autores concluíram que bactérias periodontais específicas podem afetar a progressão de taquiarritmia.

Trabalhos epidemiológicos têm sugerido que infecções crônicas, como a periodontite, estão associadas a um elevado risco de doenças CV, incluindo hipertrofia e insuficiência cardíaca, mas os mecanismos não são conhecidos. Kose et al. (2017) avaliaram os efeitos da periodontite marginal sobre a estrutura do tecido cardíaco. Para isso fizeram análises imunoistoquímicas e histopatológicas no ventrículo esquerdo de ratos e mediram os níveis séricos de lipídeos e marcadores inflamatórios (TNF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  e PCR). Utilizaram 80 ratos Sprague-Dawley divididos em 2 grupos: controle (sem ligadura) e periodontite experimental (EP, com ligadura) por 5 semanas. A PCR e IL-1 $\beta$ , o colesterol total, triglicerídeos e colesterol lipoproteico de baixa densidade foram significativamente maiores no grupo EP. De acordo com os resultados, a periodontite causa efeitos crônicos iniciais e degenerativos no tecido cardíaco, e no qual provocam mudanças hipertróficas. A exposição prolongada do estresse inflamatório sistêmico pode aumentar o risco de mudanças hipertróficas.

Aarabi et al. (2018) fizeram uma revisão que resume a evidência experimental publicada sobre 4 mecanismos que relacionam as infecções orais com as CV e discute o impacto deles na patogênese da aterosclerose. Pelo menos 4 mecanismos básicos têm sido propostos na patogênese da aterosclerose com relação as infecções orais: 1) bacteremia de baixo grau, onde as bactérias orais entram na circulação e invadem as paredes arteriais, 2) inflamação sistêmica induzida por mediadores inflamatórios liberados nos locais de inflamação oral para a circulação sanguínea, 3) autoimunidade à proteínas do hospedeiro causada pela resposta imune do hospedeiro a componentes específicos de patógenos orais; 4)

efeitos pró-aterogênicos resultantes de toxinas bacterianas específicas produzidas por bactérias patogênicas orais.

Medicina periodontal é o termo usado para descrever como a inflamação/infecção periodontal pode impactar na saúde extra oral. A periodontite tem sido vinculada a mais de 50 doenças sistêmicas. Beck et al. (2019) fizeram uma revisão que discute os estudos feitos nos últimos 100 anos com foco especial nos efeitos da doença periodontal em 3 condições patológicas, entre as quais incluíram as doenças CV. Neste caso, eles selecionaram 10 estudos que foram os primeiros do seu tipo, fornecendo observações novas ou contribuindo à mudança de paradigma, assim como estudos importantes que fizeram contribuições robustas para o progresso do entendimento das relações com as doenças CV. A maioria dos estudos revelaram associações positivas entre o status periodontal e doença CV, associações confirmadas em revisões sistemáticas. Achados dos estudos controlados randomizados testando os efeitos da terapia periodontal na saúde sistêmica foram inconsistentes.

Liu et al. (2020) fizeram uma revisão baseada em estudos relacionados com a importância da resposta inflamatória sobre a aterosclerose. Um crescente número de estudos tem reportado a associação entre a infecção oral e DAC. Até o momento, estudos epidemiológicos suportam a correlação positiva entre as infecções orais e aterosclerose. A presença de patógenos orais nas placas ateroscleróticas humanas tem sido detectada mediante vários métodos, e as infecções orais promovem aterosclerose nos experimentos em animais. Vários mecanismos estão envolvidos nas infecções orais, e portanto, promovendo aterosclerose. Primeiro, as infecções orais podem desencadear a resposta inflamatória local e sistêmica, causando dano endotelial. Os patógenos orais que entram na placa aterosclerótica podem ativar os macrófagos e causar uma resposta inflamatória intra-placa. Segundo, as infecções orais podem promover o acúmulo de colesterol nos macrófagos intra-placa, formando células espumosas. Terceiro, as infecções orais podem regular os níveis de lipídeos no plasma, e assim aumentar os níveis de triglicérides e lipoproteínas de baixa densidade. Apesar da aterosclerose causada por infecções orais estar sendo atualmente estudada, o mecanismo preciso ainda não é entendido.

## 2.2 ASSOCIAÇÃO INFECÇÕES ENDODÔNTICAS E DOENÇAS CARDIOVASCULARES.

Como exposto no item anterior, vários estudos têm sugerido o vínculo entre as doenças periodontais e DAC, no entanto, esta relação com as doenças endodônticas tem sido pouco estudada. Caplan et al. (2009) avaliaram a relação entre o tratamento endodôntico (TE) e a prevalência de DAC. Os dados foram obtidos mediante questionários, avaliações médicas e dentais. Para tal, 6651 pacientes participaram do estudo. Dentre os indivíduos com 25 ou mais dentes, aqueles com TE tiveram mais frequentemente DAC que os sem presença de TE. São necessários estudos epidemiológicos mais precisos para ter conclusões definitivas sobre as possíveis relações entre estas 2 doenças.

Cotti et al. (2011a) avaliaram se pacientes com AP sem fatores de risco CV estão mais expostos a desenvolver uma lesão aterosclerótica. Para tal, 40 homens entre 20 a 40 anos sem periodontite marginal, doença CV e fatores de risco CV tradicionais participaram do estudo: 20 tinham AP e 20 estavam sadios (controle). Todos foram submetidos a exames dentais e avaliação cardíaca completa: exame físico, eletrocardiograma, ecocardiograma convencional e Doppler tecidual e medição da reserva de fluxo endotelial (EFR, parâmetro de disfunção endotelial, níveis baixos se correlacionam com esta disfunção). Também foram avaliados os níveis de IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  e ADMA (dimetilarginina assimétrica, níveis aumentados se correlacionam com disfunção endotelial, determinante para desenvolvimento de futura aterosclerose). Os níveis de ADMA estiveram inversamente correlacionados com EFR e diretamente com IL-2. Pacientes com AP tiveram maior concentração sanguínea de IL-1, IL-2, IL-6 e ADMA e significativa redução de EFR. Portanto, os níveis aumentados de ADMA e sua relação com uma baixa EFR e elevado nível de IL-2 podem sugerir a existência de disfunção endotelial precoce em adultos jovens com AP.

Em uma revisão feita por Cotti et al. (2011b), as doenças CV foram apontadas como uma etiologia complexa determinada por fatores de risco que estão associados a componentes gênicos e fatores ambientais. Na parte biológica do

desenvolvimento de doenças CV, a inflamação crônica de baixo grau tem uma função determinante na etiopatogenia da aterosclerose. A associação da doença periodontal com as CV tem sido bem documentada, mas poucos estudos têm investigado a associação entre AP e doenças CV, e o resultado é controverso. Alguns estudos não têm sido rigorosos o suficiente para conseguir entender a relação existente entre elas. A AP está amplamente presente em dentes tratados endodonticamente, e geralmente é associada a um tratamento endodôntico de baixa qualidade, no entanto, é sempre mais difícil avaliar a “carga infecciosa endodôntica cumulativa”. É preciso um entendimento maior da conexão entre as infecções endodônticas, a inflamação e o risco CV, portanto é importante saber se a AP representa só um componente oral de uma doença sistêmica ou se compartilham uma etiologia comum.

As doenças CV têm sido associadas com um elevado risco de complicações endodônticas. O estudo feito por Brilhante Wolle et al. (2012) avaliou os efeitos do antioxidante tempol em lesões periapicais de ratos com cardiomiopatia induzida por doxorubicina (DOX). Quarenta ratos Wistar foram divididos em 4 grupos: 1) tratados com tempol durante 21 dias depois da indução da AP, 2) com cardiomiopatia induzida que foram tratados com solução salina oral do 3° ao 10° dia depois de iniciado o tratamento com DOX, 3) com cardiomiopatia induzida que foram tratadas com tempol via oral do 3° ao 10° dia depois de iniciado o tratamento com DOX, 4) Controle (tratados com solução salina durante 21 dias). A cardiomiopatia foi induzida utilizando DOX em injeções intraperitoneais durante 10 dias consecutivos (1mg/kg/dia, dose total 10mg/kg). As lesões periapicais foram induzidas por exposição pulpar no primeiro molar inferior esquerdo. Depois de 21 dias da indução da AP, os animais foram sacrificados e as mandíbulas foram coletadas para radiografias e análise histológica. A administração de tempol preveniu significativamente o estabelecimento de lesões periapicais nos ratos controle e nos ratos tratados com DOX. Os efeitos protetores do tempol foram maiores nos animais controle quando comparados com os ratos com cardiomiopatia diante da avaliação inflamatória, o que pode ser explicado pelo aumento da produção de radicais livres na cardiomiopatia.

A AP parece ser um fator de risco para a doença arterial coronariana. Petersen et al. (2014) avaliaram a significância da AP na carga aterosclerótica e examinaram o potencial efeito do tratamento endodôntico. Tomografias computadorizadas (TC) de corpo completo de 531 pacientes  $50 \pm 15.7$  anos de idade foram retrospectivamente avaliadas. A carga aterosclerótica da aorta abdominal foi quantificada usando um método de escore de cálcio. As lesões periapicais foram avaliadas e medidas usando a TC. O volume da carga aterosclerótica em pacientes com pelo menos 1 lesão AP foi maior que em pacientes sem lesão, e aumentou com a idade e com o número de AP sem tratamento endodôntico, mas não aumentou com o número de AP com tratamento endodôntico. As AP em dentes com tratamento endodôntico foram irrelevantes em relação à aterosclerose. Portanto, a AP se correlacionou positivamente com a carga aterosclerótica aórtica. A AP associada a dentes sem tratamento endodôntico foi um fator importante.

Em um novo estudo, Cotti et al. (2015) investigaram a potencial relação entre a AP e função CV, marcadores inflamatórios, EFR, ADMA e inibidor endógeno da oxido nítrico sintase (NOS) em adultos jovens. Foram examinados 40 homens e 41 mulheres entre 20-40 anos, sem doença periodontal, doença CV e fatores de risco CV tradicionais. Os dados coletados demonstraram que 20 homens e 21 mulheres tinham AP, os restantes estavam sadios (controle). Todos foram submetidos a exames dentais e avaliação cardíaca completa: exame físico, eletrocardiograma, ecocardiograma convencional e Doppler tecidual e EFR, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , espécies reativas à oxigênio (ROS) e ADMA. Os pacientes de ambos os sexos mostraram redução significativa na EFR e aumento significativo da IL-2, enquanto os níveis de ROS aumentaram significativamente só nas mulheres. Os níveis de ADMA não tiveram mudanças em mulheres com ou sem AP, mas aumentaram significativamente em homens. Concluíram que a presença de inflamação crônica em adultos jovens com AP pode causar disfunção endotelial precoce como mostrada pela diminuição no EFR. AP em homens pode influenciar o metabolismo de NOS, enquanto que em mulheres parece implicar um mecanismo prejudicial mais direto. Esta diferença é sexo dependente e pode ser atribuída à ação protetora dos estrógenos.

De acordo à revisão feita por Segura-Egea et al. (2015), a AP não é um fenômeno local, e por isso a comunidade científica médica e odontológica tem analisado a possível conexão entre AP e a saúde sistêmica. O termo “medicina endodôntica” tem nascido em conjunto com a crescente evidência que descreve a associação entre inflamação periapical e doenças sistêmicas. Os estudos em animais e humanos não são concluintes, mas sugerem uma associação entre variáveis endodônticas (AP e presença de tratamento endodôntico) e diabetes mellitus, tabagismo, DAC, etc. Vários estudos têm reportado uma alta prevalência de lesões periapicais, atraso no reparo apical, maior tamanho das lesões osteolíticas, maior probabilidade de infecções assintomáticas e pior prognóstico do tratamento endodôntico em pacientes diabéticos. Não existe evidência que prove o efeito causal da inflamação periapical no controle metabólico diabético.

*Porphyromonas endodontalis* é frequentemente encontrada nas lesões endodônticas. Estas lesões podem estar associadas a um risco maior de DAC por vias similares às da periodontite marginal. Liljestrand et al. (2016) fizeram um estudo transversal para verificar as associações entre AP e DAC. Angiografias coronárias, exames clínicos orais e radiográficos de 508 pacientes foram analisadas. A AP foi determinada por tomografia panorâmica de acordo à amplitude do espaço periapical e às rarefações periapicais nos seguintes escores: 1 (sem alteração), 2 ( $\geq 1$  espaço periapical alargado e/ou 1 rarefacção apical) 3 ( $\geq 2$  rarefações apicais). *P. endodontalis* subgingival foi determinada por análise de hibridação DNA-DNA e seus anticorpos séricos foram determinados por ELISA. Os níveis de *P. gingivalis* e imunoglobulina G sérica foram associados com um escore maior de AP. Os resultados suportam a hipótese que a AP está independentemente associada com DAC e síndrome coronária aguda.

Cintra et al. (2017) investigaram os efeitos da AP e doença periodontal (DP) no peso de órgãos de ratos com diabetes mellitus (DM). Utilizaram 80 ratos Wistar divididos em 8 grupos: normoglicêmicos, AP, DP, AP + PD, DM, DM + AP, DM + PD e DM + AP + PD. A DM foi induzida por estreptozotocina, a AP por exposição pulpar ao ambiente oral e PD por ligadura periodontal. A glicemia foi medida em 0, 6, 15 e 35 dias, o peso foi medido diariamente e os animais foram sacrificados depois de 30

dias após a indução das infecções orais. Foram pesados o fígado, rim, pâncreas, cérebro, coração, pulmões e gônadas. A glicemia foi maior em todos os grupos diabéticos depois do 6º dia, sendo maior no grupo DM + PD e DM + AP + PD que no grupo DM no 15º e 35º dia. O peso do cérebro, coração e gônadas foi significativamente maior no grupo DM + AP + PD. Rim e pulmões tiveram maior peso, independente da presença de infecções orais. O peso do fígado diminuiu em AP e/ou PD, o pâncreas diminuiu em DM independente da AP ou PD. De acordo com os resultados, a AP e a PD podem potencializar os efeitos adversos da diabetes.

O estresse oxidativo está envolvido na patogênese de várias desordens inflamatórias. A AP usualmente resulta na formação de lesão apical osteolítica causada pela resposta imune à infecção endodôntica. Espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pelas células fagocíticas em resposta aos desafios bacterianos representam um importante mecanismo de defesa do hospedeiro, mas o balanço redox alterado resulta em injúria tecidual. Hernandez-Rios et al. (2017) fizeram uma revisão com foco no papel do estresse oxidativo nos eventos sistêmicos e locais e associados na periodontite apical crônica. Durante a infecção endodôntica, a ligação de receptores do tipo Toll na superfície dos fagócitos desencadeia ativação, fagocitose, síntese de ROS, ativação das respostas humorais e celulares e produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e metaloproteinases da matriz (MMPs). O incremento de ROS altera o balance redox normal e modifica as células a um estado de estresse oxidativo. As ROS induzem dano molecular e sinalização redox alterada que resulta na perda da homeostase óssea, aumento de mediadores pró-inflamatórios, sobre-expressão e ativação de MMP, levando a ruptura do tecido apical. Por outro lado, o estresse oxidativo tem sido fortemente envolvido na patogênese da aterosclerose, onde o processo inflamatório crônico se desenvolve nas paredes arteriais. A AP crônica está associada com um elevado risco de doenças CV e especialmente aterogênese.

Bains e Bains (2018) fizeram uma revisão discutindo a evidência que mostra que um status inflamatório elevado, como aterosclerose, é a maior causa subjacente de DAC. Mediadores inflamatórios são conhecidos por levar à disfunção endotelial e têm um papel chave na iniciação, progressão e ruptura da placa aterosclerótica.

Infecções crônicas dentais como AP podem fornecer um ambiente propício para tais eventos. A aterosclerose tem mostrado compartilhar um espectro de marcadores inflamatórios com a AP. A possível correlação entre DAC e AP estão em níveis microbiológico, clínico, inflamatório e molecular.

### 2.3 MODELO DE INDUÇÃO DE CARDIOMIOPATIA POR DOXORRUBICINA

Balazs e Herman (1976) citaram a doxorubicina (DOX) como causadora de cardiomiopatias multifocais e de insuficiência cardíaca intratável devido a mecanismos cardiotóxicos dose-dependentes.

Mettler et al. (1977) considerando o desenvolvimento de numerosos agentes oncolíticos da classe da antraciclina, avaliaram um método para testar cardiotoxicidade através de um modelo de rato com indução de um tipo crônico de cardiotoxicidade. Administraram DOX a ratos em dose de 1 a 2 mg/kg/semana por 10 a 14 semanas. A maioria dos ratos desenvolveram cardiomiopatia a partir da 3<sup>a</sup> até a 23<sup>a</sup> semana depois da última injeção. Percentual de 40-70% desses ratos teve insuficiência cardíaca congestiva (derrames pleurais, ascites, hepatomegalia, cardiomegalia). Na avaliação histológica do o miocárdio, observou-se vacuolização e degeneração de miócitos, edema intersticial e fibroplasia leve; ultra estruturalmente, apresentaram ruptura sarcoplasmática com distensões das organelas sub-celulares e perda dos miofilamentos. Os resultados do estudo sugerem que o modelo de rato é preciso, reprodutível e custo-efetivo para testes de cardiotoxicidade a larga escala para estes medicamentos.

Julicher et al. (1986) investigaram o componente oxidativo no dano miocárdico em corações de ratos por meio da avaliação da atividade de superóxido dismutase e a capacidade do sistema glutathione, mecanismos protetores contra os radicais livres. Além disso, avaliaram se a formação excessiva de radicais livres influencia na patogênese da cardiomiopatia provocando dano oxidativo na membrana, mediante a avaliação da peroxidação lipídica através da formação de

malondialdeído. A cardiomiopatia foi induzida por DOX em ratos Wistar. Achados demonstraram que a DOX reduz a capacidade dos mecanismos protetores, e o dano por peroxidação lipídica muito provavelmente não é decisivo no desenvolvimento de cardiomiopatia aguda em ratos.

Utilizando ratos tratados com DOX em dose acumulativa de 21 mg/kg, Thayer (1988) avaliou a evidência de peroxidação lipídica e estresse oxidativo por vários métodos. Análises fluorométricas sugeriram que a peroxidação lipídica esteve elevada em um 40% nos corações. A atividade da glutathione peroxidase aumentou em 30%. Resultados indicaram mudanças bioquímicas persistentes que são consequentes com estresse oxidativo.

Luo et al. (1997) investigaram as mudanças bioquímicas na indução de cardiomiopatia por DOX focando no papel dos produtos aldeídos da peroxidação lipídica. Utilizaram 36 ratos Wistar, sendo 12 ratos controles. Nos ratos dos grupos experimentais foi administrada DOX 10 mg/kg intraperitoneal e foram sacrificados 1, 2, 4, 8 e 24 horas após a injeção. O status antioxidante foi avaliado por medições de glutathione. A atividade creatina quinase (CK) foi medida como um índice de injúria cardíaca. Resultados mostraram que os aldeídos no tecido cardíaco aumentaram significativamente depois do tratamento com DOX. As mudanças aconteceram cedo, com pico de aproximadamente 2 horas depois da administração da DOX, e os níveis desceram ou voltaram aos valores de base dentro de 8-24 horas. Aldeídos tóxicos, como o malondialdeído, também aumentaram. Níveis de glutathione reduzida (GSH) diminuíram inicialmente e depois aumentaram em 24 horas, enquanto os níveis de glutathione oxidada (GSSG) diminuíram inicialmente e aumentaram após o tratamento com DOX, sugerindo um esgotamento precoce da GSH e depois um fenômeno rebote. Níveis de CK aumentaram após o tratamento. Os dados confirmam o envolvimento de radicais livres e sugerem que aldeídos citotóxicos têm um papel central iniciando as etapas que levam ao dano do miocárdio depois da administração de DOX.

Em razão do estresse oxidativo aumentado e o déficit antioxidante como grandes responsáveis da cardiomiopatia induzida por DOX, Li et al. (2002) analisaram os efeitos agudos de uma dose única de DOX nas enzimas antioxidantes

do miocárdio de ratos. Injetaram via intraperitoneal 2.5mg/kg de DOX e examinaram a atividade das enzimas antioxidantes, mRNA e nível de proteínas após 1, 2, 4 e 24 horas. Não observaram mudanças significativas nas atividades da manganese superóxido dismutase (Mn-SOD), GPx nem CAT, mas a atividade da cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD) foi reduzida em todos os tempos, correlacionando-se com uma diminuição em seu conteúdo proteico. A peroxidação lipídica aumentou transitoriamente em 1, 2 e 4 horas. Tanto a depressão transitória das enzimas antioxidantes quanto o aumento transitório do estresse oxidativo com uma dose única de DOX pode anteceder mudanças sustentadas com as repetidas administrações da droga, contribuindo ao desenvolvimento da cardiomiopatia.

Considerando que a DOX está associada a cardiotoxicidade que é dose-dependente, Hayward e Hydock (2007) caracterizaram o início e o grau de cardiotoxicidade em ratos recebendo: uma única injeção intraperitoneal de 10 mg/kg de DOX (grupo 1), 10 injeções intraperitoneais de 1 mg/kg (grupo 2) e 5 injeções intraperitoneais semanais de 2 mg/kg (grupo 3). Ecocardiografia transtorácica foi utilizada cada semana para caracterizar o início e grau de cardiotoxicidade. A taxa de mortalidade foi de 80% no 28º dia no grupo 1, enquanto nos outros o 80% foi no 107º e 98º respectivamente. A função cardíaca foi claramente diferente entre os grupos 1 e 3, enquanto os grupos 2 e 3 foram semelhantes. Os resultados indicam que a administração da dose ao longo de dias ou semanas resulta em melhores taxas de sobrevivência e maiores sinais clássicos de cardiomiopatia dilatada, embora com início mais tardio, quando comparado com uma dose única de DOX.

Pontes et al. (2010) testaram outro modelo experimental de cardiomiopatia induzida por DOX em ratos. Para isso, utilizaram 16 ratos Wistar machos, randomizados em 2 grupos: grupo 1 (controle) e grupo 2 (receberam dose única de 5 mg/kg de DOX). Depois de 6 meses, os animais foram eutanasiados, os corações foram pesados, e o ventrículo esquerdo foi medido e analisado histopatologicamente. Os corações do grupo 2 aumentaram em 41% o peso, 33% o diâmetro interno, 14% do diâmetro externo e 24% da espessura da parede em relação ao grupo 1. No grupo 2, em 75% dele foi observada fibrose do tecido miocárdico, todos os animais apresentaram vacuolização citoplasmática dos

miócitos, 75% apresentou necrose do miocárdio e 87% variação do tamanho do núcleo do miócito. Portanto, a DOX promoveu alterações macro e microscópicas no tecido cardíaco de ratos.

Dentro dos mecanismos moleculares subjacentes à cardiomiopatia induzida por DOX, incluem-se alterações no status do estresse oxidativo e expressão gênica dos cardiomiócitos. Essas alterações têm sido reportadas *in vivo* durante o tratamento com DOX, mas a questão é se elas persistem depois do término do tratamento. Em atenção a isso, Richard et al. (2011) utilizaram ratos aos que se injetaram via intraperitoneal 1 mg/kg/dia de DOX durante 10 dias. Após 70 dias, os parâmetros funcionais cardíacos foram avaliados, e assim, os corações foram processados para análise histológica e estudo bioquímico de estresse oxidativo. Os ratos tratados com DOX apresentaram diminuição da contratibilidade do ventrículo esquerdo e aumento dos marcadores de estresse oxidativo miocárdicos (TBARS). Em conclusão, o estudo demonstrou que após 2 meses do término do tratamento com DOX, as alterações cardíacas persistiram, refletindo um aumento do estresse oxidativo e remodelação patológica ligada ao desenvolvimento de disfunção contrátil.

Tendo em conta que a cardiotoxicidade da DOX tem uma progressão complexa e multifatorial, Lagoa et al. (2014) identificaram mecanismos bioquímicos iniciais levando a um desequilíbrio sustentado da bioenergética celular. Para isso, os autores mediram marcadores bioquímicos avaliando a evolução temporal depois do tratamento com DOX em ratos que receberam 20 mg/kg em dose única via injeção intraperitoneal; ratos controle receberam solução salina. O tratamento com DOX levou ao aumento significativo a partir do 3º dia da oxidação lipídica, da atividade da CAT e da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; e no 5º dia, diminuindo a atividade da glutathione peroxidase. Portanto eles seriam biomarcadores iniciais da cardiomiopatia por DOX.

Shen et al. (2016) compararam os protocolos de administração de injeção contínua e intermitente de DOX sob a mesma dose acumulativa (12 mg/kg) para estabelecer um modelo de cardiomiopatia dilatada em ratos com maior taxa de sobrevivência. Utilizaram 150 ratos Sprague-Dawley divididos em 3 grupos: controle (solução salina), grupo 1 (administração de 1mg/kg 2 vezes na semana) e grupo 2 (2

mg/kg uma vez por semana). A taxa de mortalidade no grupo 1 e 2 foi de 22% e 48% respectivamente. De acordo com ecocardiografia, os 2 grupos apresentaram dilatação significativa da câmara e redução da função cardíaca. O peptídeo natriurético cerebral no plasma e a proteína C-reativa aumentaram significativamente nos 2 grupos. O metabolismo miocárdico estudado revelou uma diminuição da viabilidade miocárdica, necrose e fibrose intersticial nos ventrículos esquerdos dos 2 grupos experimentais. A DOX administrada nos 2 regímenes induziram cardiomiopatia dilatada, em quanto a administração a menores doses com injeções mais frequentes reduziram a taxa de mortalidade.

Um protocolo otimizado para induzir a cardiomiopatia que leve a uma disfunção sistólica ainda não é claro. O'Connell et al. (2017) realizaram um estudo para comparar protocolos de indução de curto e longo prazo mediante injeções de DOX em ratos. Utilizaram ratos que foram divididos em 3 grupos: Grupo ST (curto prazo, 6 injeções intraperitoneais de DOX em doses de 2.5mg/kg cada durante 2 semanas (dose total 15 mg/kg)), grupo LT (longo prazo, injeções intraperitoneais semanais de 2mg/kg cada durante 9 semanas (dose total 18 mg/kg)) e grupo controle (solução salina). Os animais foram submetidos a ecocardiografias na linha de base e no final do tratamento e os corações foram coletados para análise em microscopia de luz e quantificação de colágeno. As análises morfológicas do miocárdio em ambos os grupos tratados com DOX mostraram padrões idênticos de cardiomiócitos inchados e vacuolados e desorganização das miofibrilas. Houve uma pronunciada fibrose intersticial no coração dos dois grupos da DOX quando comparados ao controle, sem diferença na fibrose intersticial entre os grupos ST e LT. A ecocardiografia mostrou que o grupo LT teve achados estruturais e funcionais compatíveis com cardiomiopatia dilatada, incluindo aumento das dimensões sistólicas e diastólicas do ventrículo esquerdo e redução da fração de ejeção quando comparado ao grupo ST e controle. Os resultados indicam que a injeção em longo prazo é mais efetiva que em curto prazo, induzindo disfunção ventricular esquerda e alterações cardíacas estruturais semelhantes às encontradas na cardiomiopatia dilatada. Embora os dois modelos sejam efetivos induzindo à mudanças histológicas no miocárdio, a discordância entre as mudanças funcionais e estruturais

provavelmente sejam entre o tempo percorrido, entre o estabelecimento do dano tissular, e o desenvolvimento de disfunção cardíaca.

O mais reconhecido efeito cardiotoxíco é a disfunção do ventrículo esquerdo, mas dados ecocardiográficos mostram comprometimento significativo da função do ventrículo direito. Para esclarecer esta questão, Anghel et al. (2018) investigaram o potencial da DOX em induzir cardiotoxicidade aguda no ventrículo direito no mesmo tempo que no esquerdo. Injetaram via intraperitoneal dose única de 15 mg/kg de DOX em ratos. Os ratos tratados com DOX tiveram uma diminuição do peso corporal e dos corações. Análises bioquímicas tecidual do ventrículo direito revelaram aumento significativo dos níveis de MDA e uma redução da atividade CAT, glutatona redutase e glutatona peroxidase num percentual de 13%, 27% e 18% respectivamente quando comparado ao controle. Análises histopatológicas e de microscopia eletrônica mostraram que a DOX induziu dano nos 2 ventrículos e um aumento de fibras colágenas intersticiais comparadas ao controle. As vias apoptóticas induzidas por mitocôndria também foram ativadas em ambos os ventrículos. Os resultados mostraram que a DOX exerceu efeitos tóxicos ao mesmo tempo nos dois ventrículos, o que pode ser mediado através de apoptose.

Medeiros-Lima et al. (2019) investigaram a progressão das mudanças estruturais e funcionais cardíacas induzidas pela DOX: Utilizaram ratos Sprague-Dawley que receberam injeções de DOX em dose de 1 mg/kg intraperitoneal durante 10 dias consecutivos e foram eutanasiados 1 (DOX1), 2 (DOX2) ou 4 (DOX4) semanas depois da última injeção. O grupo controle recebeu solução salina. Os corações foram montados num sistema de perfusão, os fragmentos de ventrículo esquerdo processados para microscopia e ensaios de estresse oxidativo. O sangue foi coletado para avaliação da troponina cardíaca I. Todos os grupos tratados com DOX mostraram cardiomiócitos inchados e vacuolados com desordem dos miofilamentos e dano mitocondrial; estas mudanças foram evidentes depois de 1 semana e ficaram mais pronunciadas depois de 4 semanas. Os níveis de troponina cardíaca I foram significativamente maiores em DOX1 e aumentou ainda mais em DOX4 quando comparado ao grupo controle. O peroxidação lipídica aumentou em DOX1. A atividade da GPx aumentou em DOX4. As alterações morfológicas resultaram em remodelamento cardíaco, incluindo fibrose intersticial, apoptose e

comprometimento significativo da função contrátil e de relaxamento no DOX 4 em comparação ao grupo controle. Estes achados suportam a ideia de que a cardiotoxicidade por DOX acontece de forma contínua provocando uma lesão cardíaca irreversível.

## 2.4 MODELO DE INDUÇÃO DA PERIODONTITE APICAL CRÔNICA

Burstone e Levy (1950) fraturaram os primeiros molares inferiores de 20 Hamsters Golden para expor a polpa. Os animais foram sacrificados entre o 3° e 186° dia. Os achados microscópicos revelaram resposta inflamatória periapical depois de 8 dias. Após 23 dias, lesões granulomatosas foram observadas nos ápices dos dentes fraturados. Proliferação epitelial e formação de cistos foram observados em várias lesões granulomatosas mais antigas.

Takehashi et al. (1965) realizaram um estudo para observar as mudanças patológicas resultantes de exposições pulpares experimentais não tratadas em ratos germ-free comparadas à de ratos convencionais com uma microflora normal complexa. Os tecidos pulpares foram expostos na superfície oclusal dos primeiros molares direitos superiores com uma broca de carbide redonda. Os animais foram sacrificados após vários tempos pós-operatórios (1 a 42 dias), e os tecidos maxilares foram seccionados. No 8° dia, foi observado tecido pulpar vital remanescente somente na metade apical radicular nos animais convencionais. Necrose pulpar completa com formação de granulomas e abscesso aconteceram em todos os espécimes de mais dias, não houve nenhuma evidência de reparo. Em contraste, não foram encontradas polpas necrosadas, granulomas apicais nem abscessos nos animais germ-free. Ponte dentinária começou a se formar no 14° dia, e foi completada entre o 21° e o 28° dia, independente do ângulo ou severidade da exposição pulpar. Estes resultados indicam que a presença ou ausência de flora microbiana é o maior determinante para o reparo de polpas expostas nos ratos.

Torneck e Tulananda (1969) induziram inflamação periapical nos molares e pré-molares de cães mediante pulpectomias e deixando-as abertas ao ambiente oral com períodos pós-operatório entre 20 e 118 dias. Alguns dentes foram tratados e outros deixados abertos como controle. Avaliações histológicas dos dentes tratados e não tratados revelaram que a reação presente no ápice radicular foi influenciada pelo tempo em que o canal permaneceu exposto ao ambiente oral e o sucesso na remoção pulpar. Periapicalmente, a reação variou de inflamação intensa à formação de cisto até a manutenção do periodonto normal. Houve também reabsorção de cimento e dentina e um alargamento e recontornado do espaço periodontal quando a inflamação era mais intensa no espaço periapical. Outras mudanças foram o remodelado das trabéculas periapicais para acomodar as mudanças no tamanho, e na atividade do cimento periapical nos casos em que houve polpa totalmente necrótica e uma extensão da inflamação aos tecidos circundantes. Onde não aconteceu a necrose pulpar, houve alterações na formação normal de dentina dentro do espaço pulpar, formação de cimento no ápice radicular e mudança menor a ausente no espaço periapical. Os resultados indicaram que a remoção da polpa dentária e a exposição do canal ao ambiente oral pode resultar em estabelecimento de abscesso periapical. O padrão total de mudança é possivelmente representativo em cães, mas a correlação direta com humanos não pode ser feita.

O desenvolvimento de patologias pulpares e periapicais em molares de ratos foi estudada por Rosengren e Winblad (1975) depois de inocular *Streptococcus mutans* dentro da câmara pulpar. A destruição de osso alveolar periapical pôde ser demonstrado radiograficamente e histopatologicamente. Altos números de células inflamatórias na câmara pulpar e na região periapical, assim como dentina cariada, estiveram presentes. As bactérias inoculadas na polpa também foram coletadas do sangue sistêmico. A identidade entre as bactérias pulpares inoculadas e as bactérias no sangue foi comprovada por precipitação em gel.

Nas lesões periapicais endodônticas, a presença e localização das bactérias são controversas. Várias técnicas experimentais têm mostrado diferentes resultados, talvez devido aos artefatos como a contaminação durante a coleta dos espécimes. Walton e Ardjmand (1992) examinaram as bactérias em lesões periapicais em um modelo animal. A necrose pulpar foi induzida expondo molares de macacos e

fechando a exposição depois de 1 semana com amalgama. As lesões foram desenvolvidas em 18 ápices. Depois de 7 meses, dentes e tecidos circundantes foram removidos, processados histologicamente e corados pela coloração de Gram. As bactérias, principalmente Gram positivas, foram identificadas em grande quantidade nos tecidos necróticos dos canais. Dois canais demonstraram aglomerações bacterianas no forame apical. No tecido ao redor do ápice, não foram observadas colônias bacterianas e sim somente microrganismos intracelulares. As lesões inflamatórias pareciam resistir à disseminação de bactérias, limitando-as ao espaço do canal. Os autores concluíram que as aglomerações bacterianas no forame apical podem contaminar os tecidos periapicais durante a cirurgia e extração e dar falsos positivos nas amostras microbiológicas.

Yamasaki et al. (1994) investigaram histologicamente e histometricamente as mudanças nos tecidos pulpare e periapicais após exposição pulpar em ratos. Todos os animais foram submetidos a exposições pulpares no primeiro molar inferior esquerdo. Os animais foram eutanasiados entre o 1° e 56° dia depois da exposição pulpar, e as mandíbulas processadas para análise histológica. Histologicamente, a necrose pulpar se estendeu gradualmente desde a parte superior do tecido pulpar até o ápice, com a inflamação começando no tecido periapical já em etapas iniciais. Devido ao desenvolvimento de lesão apical, também foi encontrada reabsorção de osso alveolar e cimento. Histometricamente, a extensão da necrose pulpar aumentou gradualmente desde o 1° até o 28° dia. A extensão vertical da lesão periapical aumentou significativamente após 14 dias, enquanto a extensão horizontal e a área total aumentaram significativamente após 7 dias. A lesão periapical se estendeu primeiramente em direção mesiodistal e depois em direção vertical.

O diabetes mellitus está associado com a diminuição das defesas contra a infecção e o aumento do risco de doença periodontal. Nisto, os efeitos do DM no tecido periapical, que diferem estruturalmente do tecido periodontal, são desconhecidos. Iwama et al. (2003) avaliaram os efeitos do DM tipo 2 no desenvolvimento de lesões periapicais em ratos após exposição pulpar dos primeiros molares inferiores. Ratos GK com DM espontânea não insulina dependente e ratos Wistar sem DM (controle) receberam dieta normal de laboratório

e água ou solução de sucrose 30%. Após 2 e 4 semanas da exposição pulpar, as análises histológicas mostraram que a reabsorção do osso alveolar foi mais severa, e que as lesões periapicais foram maiores nos ratos diabéticos. Esses resultados sugerem que as condições metabólicas produzidas pelo DM tipo 2 aumentam o desenvolvimento de lesões periapicais em ratos.

A evidência sugere que os pacientes diabéticos são significativamente mais afetados pelas infecções de origem endodôntica. Armada-Dias et al. (2006) avaliaram radiográfica e histologicamente o desenvolvimento de inflamação perirradicular em ratos diabéticos depois de indução de infecção pulpar. As polpas dos primeiros molares inferiores de ratos normais e com diabetes-induzida por estreptozotocina foram expostas e deixadas em contato ao ambiente oral por 21 e 40 dias. Depois os animais foram sacrificados, as mandíbulas cirurgicamente removidas, fixadas em formalina e depois radiografadas. As radiografias foram escaneadas e as imagens computadorizadas para avaliar a área total das lesões mediante um software específico. As análises radiográficas revelaram que os ratos diabéticos apresentaram lesões perirradiculares significativamente maiores quando comparadas com as dos ratos controles, independentemente do tempo experimental. Exames histopatológicos revelaram lesões perirradiculares maiores e exsudato infamatório mais severo nos ratos diabéticos. Os achados indicam que os ratos diabéticos podem ser mais propensos a desenvolver lesões periapicais grandes, possivelmente pela redução da capacidade de defesa contra microrganismos.

Tanomaru et al. (2008a) avaliaram diferentes métodos de indução de lesões periapicais em cães. Cinquenta e seis canais radiculares de dentes de cães foram divididos em 4 grupos: no G1 e no G2 os canais radiculares foram expostos à cavidade bucal por 180 dias; no G3 e no G4 os canais foram expostos por 7 dias e depois as aberturas coronárias foram restauradas e permaneceram seladas durante 53 dias. Os ápices do G1 e G3 foram perfurados, enquanto os do G2 e do G4 foram mantidos intactos. Após o período de indução, os cães foram sacrificados. Cortes seriados foram obtidos e corados por hematoxilina e eosina. A reação inflamatória periapical e reabsorção dos tecidos mineralizados foram significativamente menos intenso no G2 que nos demais grupos. Não houve diferença histopatológica entre as

lesões periapicais induzidas nos dentes com selamento coronário. Por outro lado, quando o selamento coronário não foi realizado, maior intensidade de lesão periapical induzida foi observada nos dentes com perfuração apical.

Tanomaru et al. (2008b) fizeram um estudo para avaliar a distribuição microbiana no sistema de canais radiculares (SCR) após indução de lesões periapicais em dentes de cães mediante diferentes métodos. Cinquenta e dois canais radiculares foram divididos em 4 grupos conforme o estudo anterior; as amostras processadas e coradas pelo método de Brown e Brenn para avaliação da presença ou ausência e distribuição dos microrganismos. Todos os grupos apresentaram microrganismos em todo o SCR. Foi observado maior número de microrganismos nas paredes do canal radicular, delta apical e túbulos dentinários, seguido pelo cimento e áreas de reabsorção cementária. Apesar de utilizar diferentes períodos de exposição dos canais radiculares ao meio bucal, os métodos usados para indução das lesões periapicais permitiram semelhante distribuição de microrganismos no SCR.

Tanomaru-Filho et al. (2009) avaliaram as dinâmicas do desenvolvimento de lesões periapicais. Canais radiculares de cães foram expostos ao ambiente oral e depois selados por 7 dias (grupo A), 15 dias (grupo B), 30 dias (grupo C) e 60 dias (grupo D). Depois de cada período experimental, foram tiradas radiografias para detectar reabsorção óssea periapical. Além disso, secções histológicas da região periapical foram preparadas. As lesões foram radiograficamente visíveis aos 15 e 30 dias e tiveram tamanho similar nesses períodos. Aos 60 dias, as lesões foram maiores que em outros períodos. A reabsorção óssea foi detectada histologicamente aos 7 dias. Os valores maiores de reabsorção óssea foram observados aos 30 e 60 dias. Os resultados dos métodos de avaliação foram semelhantes somente aos 30 dias. Não houve correlação entre os resultados radiográficos nem histológicos. Portanto, as radiográficas periapicais não detectaram lesão periapical nas etapas iniciais, as lesões começaram a estar evidentes radiograficamente quando a área de reabsorção óssea aumenta.



### 3 PROPOSIÇÃO

Na endodontia, poucos estudos têm avaliado o papel das infecções endodônticas a respeito das doenças CV. Devido a ausência de estudos avaliando a relação entre cardiomiopatia e infecção endodôntica, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se a periodontite apical crônica influencia no desenvolvimento de cardiomiopatia-induzida em ratos medindo o estresse oxidativo e a atividade das enzimas antioxidantes. Para isso, foi avaliado:

- Se a periodontite apical crônica aumenta o estresse oxidativo nos ventrículos do coração em ratos com e sem cardiomiopatia-induzida.

- Se a periodontite apical crônica modifica a atividade das enzimas Catalase, Glutathione Peroxidase e Superóxido dismutase nos ventrículos do coração de ratos com e sem cardiomiopatia-induzida.

A hipótese de nulidade é que a periodontite apical crônica não influencia no desenvolvimento de cardiomiopatia-induzida em ratos.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

O projeto foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sendo aprovado sob o número 003/2019 (Anexo A). Após aprovação, os experimentos foram iniciados.

O protocolo experimental utilizado neste projeto seguiu os princípios de ética e experimentação animal, baseado na Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, e na Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal que visam ao aprimoramento de condutas na experimentação animal.

Foram utilizados quarenta e dois ratos Wistar machos apresentando no começo do estudo um peso entre 240 – 280 gr. e 45 dias de idade. Eles foram mantidos sob condições controladas (temperatura de 22°C, 70% humidade e ciclo dia/noite de 12 horas /12 horas, dieta em base a ração padrão e com acesso livre a água filtrada) (Brilhante Wolle et al., 2012) em gaiolas coletivas de 3-4 animais cada no Biotério de Experimentação animal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Os animais foram inicialmente divididos aleatoriamente em 4 grupos:

Grupo Controle (C) (n=3): sem periodontite apical e sem cardiomiopatia-induzida

Grupo AP (n=10): com periodontite apical e sem cardiomiopatia-induzida

Grupo CM (n=12): sem periodontite apical e com cardiomiopatia-induzida

Grupo APCM (n=17): com periodontite apical e com cardiomiopatia-induzida.

#### 4.2 INDUÇÃO DA PERIODONTITE APICAL CRÔNICA

Os ratos dos grupos AP e APCM foram pesados e logo anestesiados com injeção intramuscular de xilazina (1,5 ml/kg, Ansedan, Vetbrands, Brasil) e ketamina (1,5 ml/kg, Ketalar, Cristália, Itapira, SP, Brasil). Posteriormente, os ratos foram colocados em uma mesa cirúrgica especial com o ventre voltado para cima, o que permitiu o franco acesso à região superior da cavidade oral, assim como mostram as figuras 4.1 e 4.2.

Figura 4.1 campo operatório, instrumental cirúrgico, mesa cirúrgica, motor elétrico



Fonte: A autora

Figura 4.2 Rato anestesiado e sedado posicionado ventralmente na mesa cirúrgica no ato da indução da periodontite apical crônica



Fonte: A autora

Com o auxílio de um motor cirúrgico, as polpas dos primeiros e segundos molares superiores foram cirurgicamente expostas com uma broca esférica carbide de tamanho  $\frac{1}{4}$  para baixa rotação (Angelus Prima Dental, Brasil). Feita a exposição, uma lima #10 e #15 (Dentsply Maillefer, Ballaigues/Suíça) foi utilizada para constatar a exposição na câmara pulpar (Figura 4.3). A polpa foi deixada exposta à cavidade oral por 30 dias para permitir o desenvolvimento da lesão periapical (Brilhante Wolle et al., 2012). Os animais foram deixados em gaiolas limpas aguardando a recuperação da anestesia.

Figura 4.3 Exposição pulpar no primeiro e segundo molar superior direito



Fonte: A autora

### 4.3 INDUÇÃO DA CARDIOMIOPATIA POR DOXORRUBICINA.

Foi utilizada a metodologia de indução de “curto prazo” proposta por O’Connell et al. (2017): após a indução da periodontite apical, os animais receberam Cloridrato de Doxorubicina (Adriblastina RB, Pfizer, Brasil) (2,5mg/kg/dose) (Figura 4.4) aplicada em 5 injeções via intraperitoneal num período de 2 semanas, totalizando 12,5mg/kg no final do período de indução. O preparo da solução de Doxorubicina (DOX) foi feita diluindo o pó do medicamento em soro fisiológico (LBS Laborasa, São Paulo/SP) de acordo ao cálculo da concentração necessária de medicamento a ser injetado. Esta solução foi preparada imediatamente antes de cada sessão de indução, devido à instabilidade da solução após 24 horas.

Figura 4.4 Cloridrato de Doxorubicina utilizado na indução da cardiomiopatia.



Os animais do grupo controle e do grupo AP receberam solução salina (0,9% NaCl) no mesmo protocolo de administração.

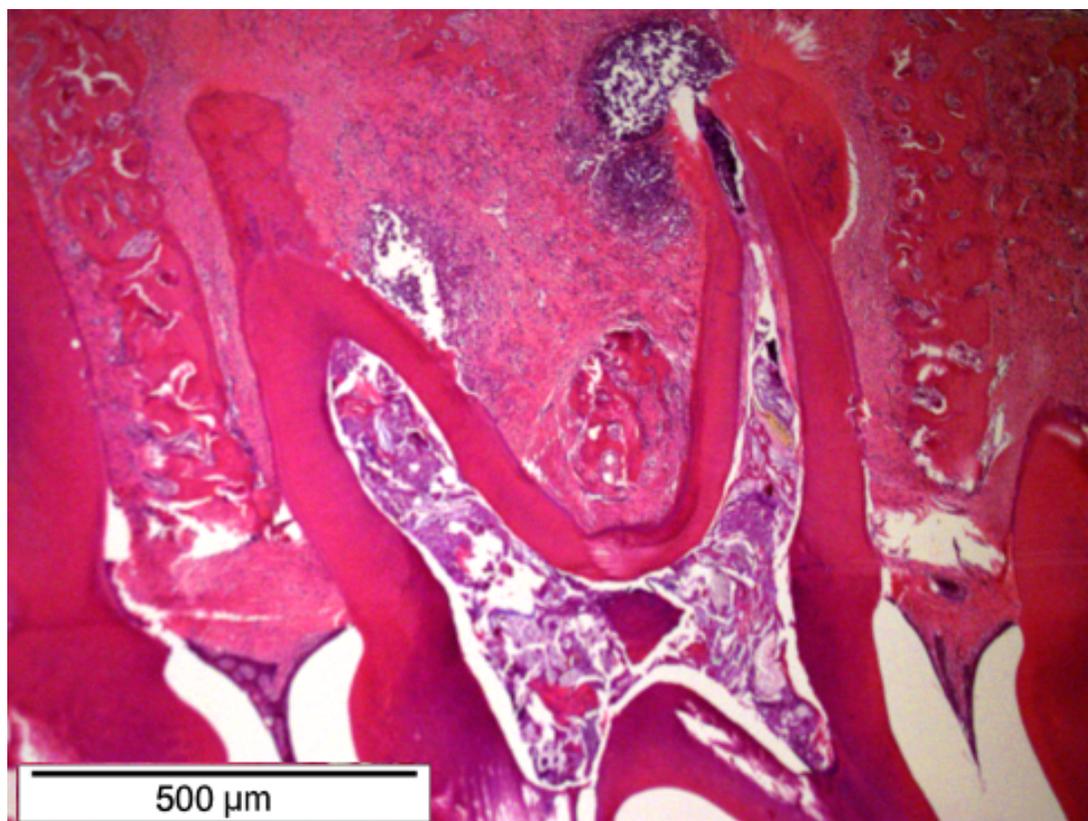
O peso dos animais foi registrado ao longo do período experimental. Outros sinais de toxicidade como piloereção e alteração da atividade motora também foram registrados (Brilhante Wolle et al., 2012).

#### 4.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICO

Depois de 30 dias após o início da indução de cardiomiopatia, os animais foram anestesiados e eutanasiados por decapitação em guilhotina. Seguindo o protocolo padrão do Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, a maxila foi cirurgicamente removida, dissecada e fixada mediante imersão em 30 mL de fixador composto de glutaraldeído 0,1% + 4% de formaldeído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 preparado 30 minutos antes do sacrifício dos animais. Então, o fixador com o espécime foi levado para 3 ciclos de 5 minutos cada, em aquecimento controlado de 37 °C em micro-ondas (Pelco 3400, Ted Pella, Redding, CA, USA) com agitação por bolhas de ar (Cooler pump Pelco 3420, Ted Pella, Redding, CA, USA), e mais 4 horas à temperatura ambiente em agitação lenta, e deixada em 4 °C overnight (Massa; Arana-Chavez, 2000). As amostras foram desmineralizadas por imersão em EDTA 4,13% pH 7,2 renovada diariamente por 40 dias. Blocos de parafina contendo as maxilas foram posicionados no micrótomo para aquisição de secções seriadas longitudinalmente no sentido mesio distal com uma espessura de 5 µm. Metade das secções foram coradas em hematoxilina-eosina e a outra metade foi corada para a técnica histobacteriológica de Brown e Breen modificado por Taylor, ambas a serem examinadas sob microscopia ótica. Nas secções coradas com hematoxilina-eosina foi avaliada a presença de lesão periapical, infiltrado inflamatório, zonas de necrose pulpar, região da exposição pulpar e estruturas associadas. Nas secções coradas com o método de Brown e Breen modificado por Taylor foi avaliada a presença de biofilme bacteriano. As microfotografias digitais foram transferidas a um computador para sua análise (Brilhante Wolle et al., 2012; Nabeshima, 2015).

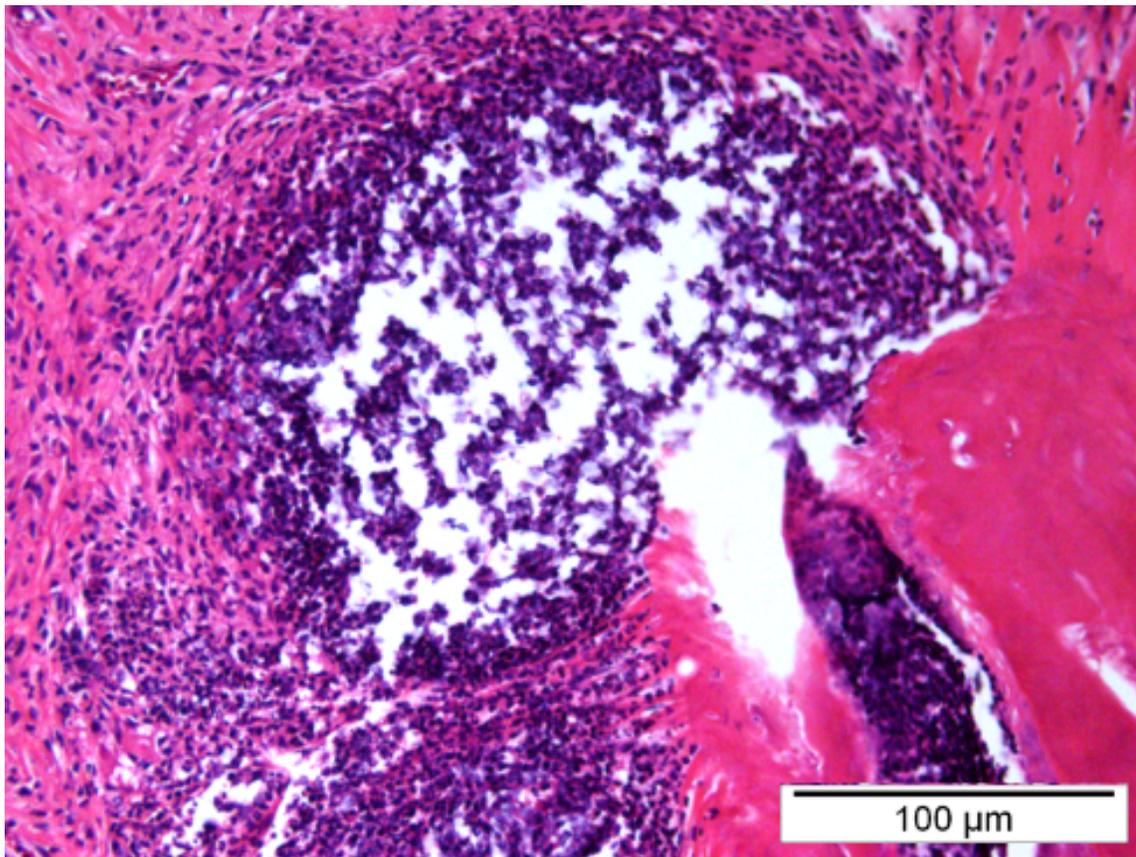
As seguintes imagens têm como objetivo ilustrar os achados histopatológicos e assim demonstrar a presença de lesão periapical.

Figura 4.5 – Microfotografia representativa de um espécime do grupo AP



Fonte: A autora

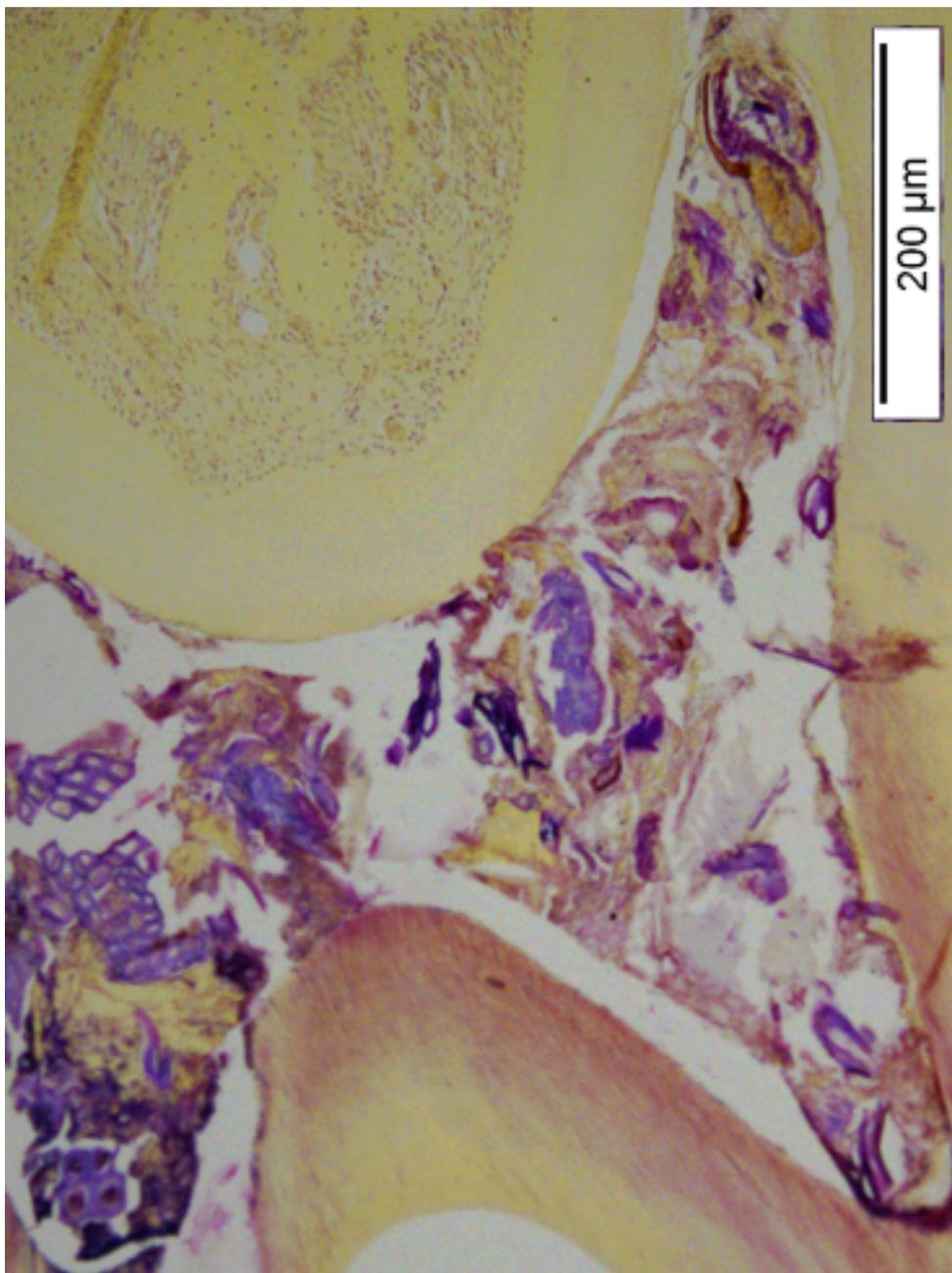
Figura 4.6 – Microfotografia representativa de um espécime do grupo AP



Fonte: A autora

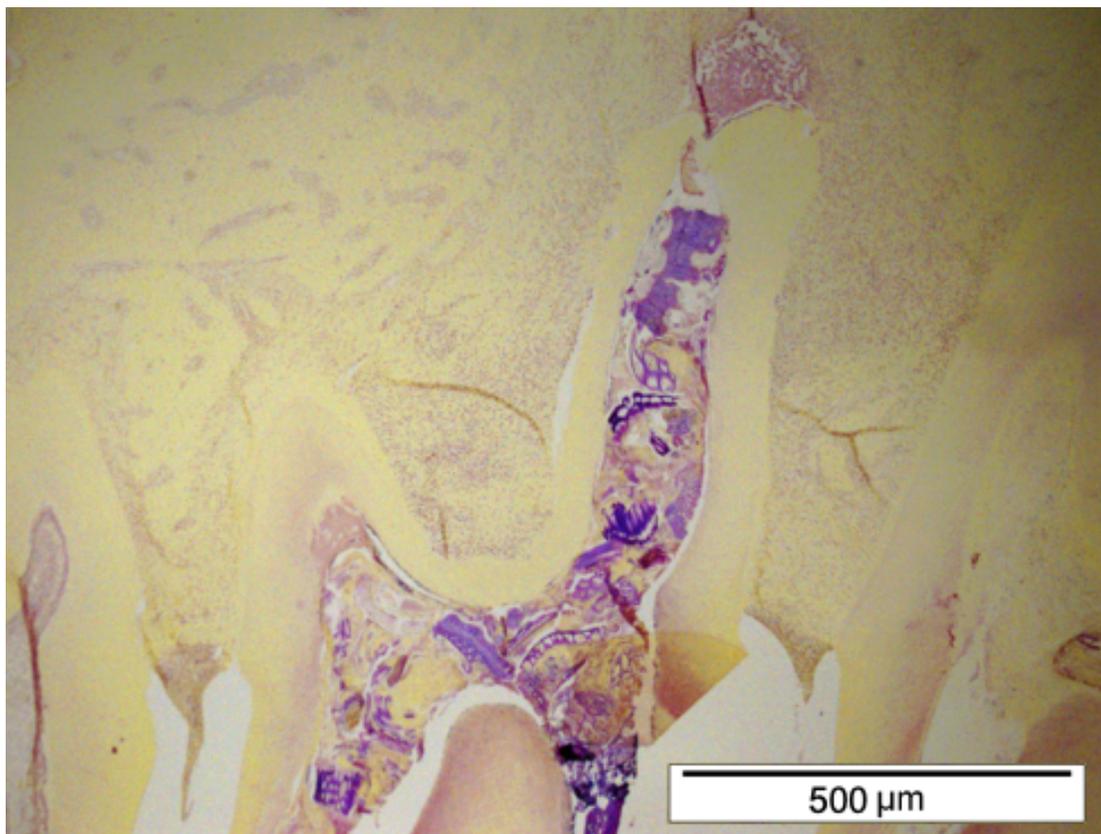
As microfotografias das figuras 4.5 e 4.6, mostram um infiltrado inflamatório crônico na região adjacente ao forame apical, apreciando-se neutrófilos polimorfonucleares.

Figura 4.7 – Microfotografia representativa de um espécime do grupo APCM



Fonte: A autora

Figura 4.8 – Microfotografia representativa de outro espécime do grupo APCM



Fonte: A autora

Nas microfotografias das figuras 4.7 e 4.8 observam-se bactérias coradas em roxo em toda a extensão da câmara pulpar e canal radicular.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Para confirmar a presença de cardiomiopatia e avaliar o nível de comprometimento cardíaco, depois da eutanásia, os corações foram imediatamente coletados e mantidos em gelo seco para posteriormente serem conservados em freezer -80°C até o momento do seu processamento. O peso dos corações também foi registrado.

Os corações então, foram submetidos a análises bioquímicas para determinar a peroxidação lipídica, atividade da enzima Catalase, atividade da enzima Superóxido dismutase e atividade da enzima Glutathione peroxidase.

##### 4.5.1 Determinação da peroxidação lipídica

A determinação da peroxidação lipídica foi feita através do método descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990) baseado na determinação do malonaldeído (MDA) pela sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS): os corações foram homogeneizados a 10% em tampão  $K_2HPO_4$  50mM pH 7,0. Posteriormente foram desproteinizados em ácido tricloroacético 20%, adicionando hidroxi-butil-tolueno 4% (BHT) para estabilizar a reação. As amostras foram agitadas e deixadas no gelo por 30 minutos. Na sequência, elas foram centrifugadas a 8000 rpm por 2 minutos; foi utilizado o sobrenadante ao qual foi adicionado igual volume de TBARS 0,7% para então aquecer a mistura em banho Maria a 95°C por 45 minutos. Depois deste período, as amostras foram resfriadas e lidas em espectrofotômetro a 535 nm (DU 800 Spectrophotometer, Beckman Coulter, California, USA) (Nogueira, 2004)

#### **4.5.2 Determinação da atividade da Catalase**

Os corações foram homogeneizados a 10% em tampão  $K_2HPO_4$  50mM pH 7.0. O homogenado foi centrifugado a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. Foi utilizado o sobrenadante para realizar o ensaio de acordo com o método de Aebi (1984). O meio de reação consistiu em 890  $\mu$ l de tampão fosfato 50 mM pH 7,4 ( $KH_2PO_4$  50mM e  $K_2HPO_4$  50mM 1:1,5) e 10  $\mu$ l da amostra e a reação foi iniciada adicionando 100  $\mu$ l de  $H_2O_2$  100mM para então fazer as leituras no espectrofotômetro a 240 nm durante 10 minutos a 24°C (Nogueira, 2004).

#### **4.5.3 Determinação da atividade da Superóxido dismutase**

Os corações foram homogeneizados a 10% em tampão  $K_2HPO_4$  50mM pH 7.0. O homogenado foi centrifugado a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. Foi utilizado o sobrenadante para realizar o ensaio de acordo com o método de Paoletti et al. (1986) O meio de reação consistiu em 800  $\mu$ l de tampão TEA-DEA, 40  $\mu$ l de NADPH, 25  $\mu$ l de solução EDTA- $MnCl_2$  e 100  $\mu$ l da amostra. A produção de superóxido no sistema é induzida pelo mercaptoetanol adicionado ao meio (100  $\mu$ l) onde posteriormente foi observada a queda da absorbância por 25 minutos, fazendo as leituras a 340 nm e 25°C.

#### **4.5.4 Determinação da atividade da Glutathione Peroxidase**

Os corações foram homogeneizados a 10% em tampão  $K_2HPO_4$  50mM pH 7.0. O homogenado foi centrifugado a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. Para determinar a atividade desta enzima foi utilizado o sobrenadante de acordo ao método de PUNCHARD e KELLY (1996). O meio de reação foi composto por 350  $\mu$ l de tampão fosfato de potássio 171 mM + azida sódica 4,28 mM + EDTA 2,14 mM, 250  $\mu$ l de glutathione reduzida 6 mM, 250  $\mu$ l de NADPH 0,9 mM, 250  $\mu$ l de glutathione

redutase 2 U/ml e 150 µl da amostra. Foram adicionados 250 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,72 mM e após uma rápida homogeneização, imediatamente foram feitas as leituras no espectrofotômetro a 340 nm durante 300 segundos, com leituras registradas a cada 15 segundos a 22°C.

#### **4.5.5 Determinação da concentração de proteína total**

Em todos os ensaios de determinação da atividade enzimática, a concentração de proteína total foi determinada utilizando o método de Lowry et al. (1951) que usa a albumina de soro bovino como padrão (Nogueira, 2004)

#### **4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram coletados e tabulados em Excel possibilitando assim a posterior análise estatística. Esta foi realizada com o programa Stata/SE 15.0 (Texas, USA).

Para testar a normalidade das amostras, foi utilizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk.

Devido a que as amostras apresentaram normalidade, foi utilizado o teste ANOVA de 1 fator e complementado pelo teste post hoc de Bonferroni.

O nível de significância utilizado foi de 5%.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 DADOS GERAIS

#### 5.1.1 Número de animais, taxa de mortalidade e sobrevivência.

Os animais foram acompanhados diariamente ao longo do estudo. Os dados coletados se apresentam a seguir.

A tabela 5.1 mostra os dados descritivos sobre os animais utilizados no começo do estudo e a taxa de mortalidade por grupo.

Tabela 5.1 – Quantidade e taxa de mortalidade por grupo

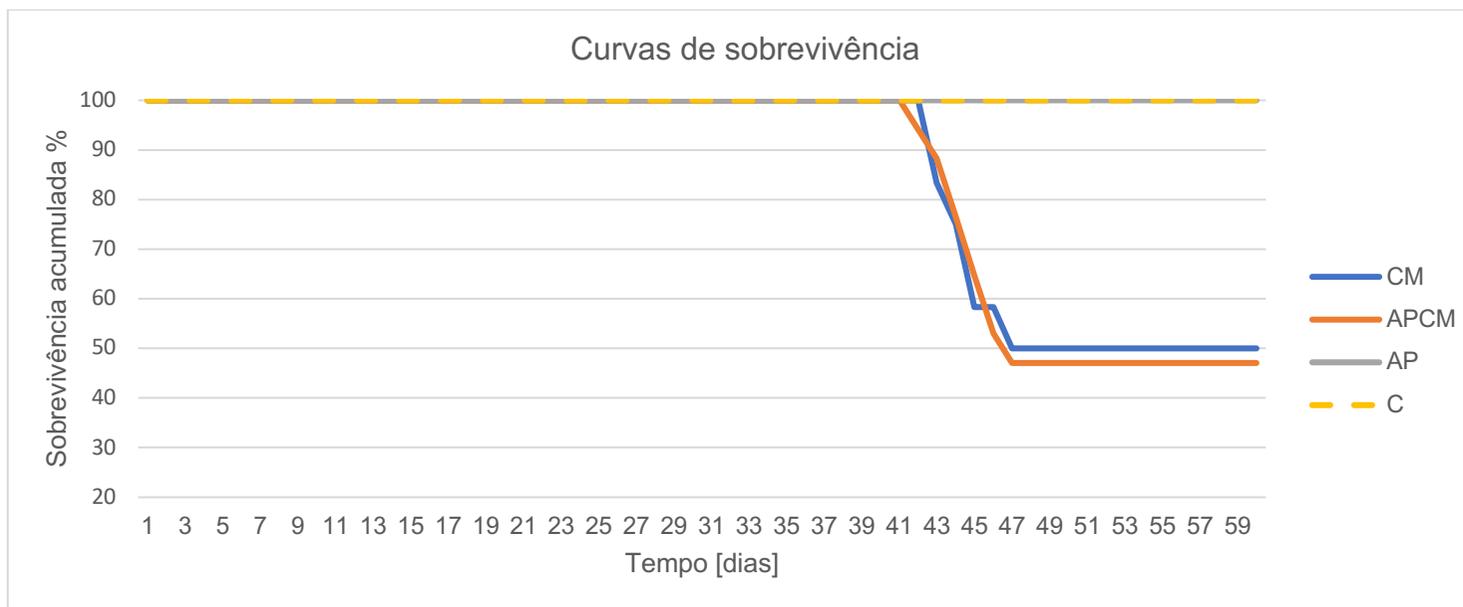
<b>Grupo</b>	Nº animais iniciais	Nº de animais no final	Taxa de mortalidade
<b>CM</b>	12	6	50%
<b>APCM</b>	17	8	53%
<b>AP</b>	10	10	0%
<b>C</b>	3	3	0%
<b>Total</b>	42	30	

Fonte: A autora

A figura 5.1 mostra as curvas de sobrevivência por grupo. O dia 1 corresponde ao dia em que foi feita a indução da periodontite apical crônica. O dia 30 foi o dia 1º da indução da cardiomiopatia. O dia 60 foi o dia da eutanásia dos animais.

Observa-se que a sobrevivência nos grupos APCM e CM diminuiu no 42º e 43º, respectivamente, e manteve-se estável a partir do 47º dia.

Figura 5.1 – Gráficos das Curvas de sobrevivência por grupo. O gráfico mostra a porcentagem de sobrevivência por dia em cada grupo. Grupo: CM: cardiomiopatia induzida; APCM: cardiomiopatia e periodontite apical crônica induzidas; AP: periodontite apical crônica induzida; C: controle.



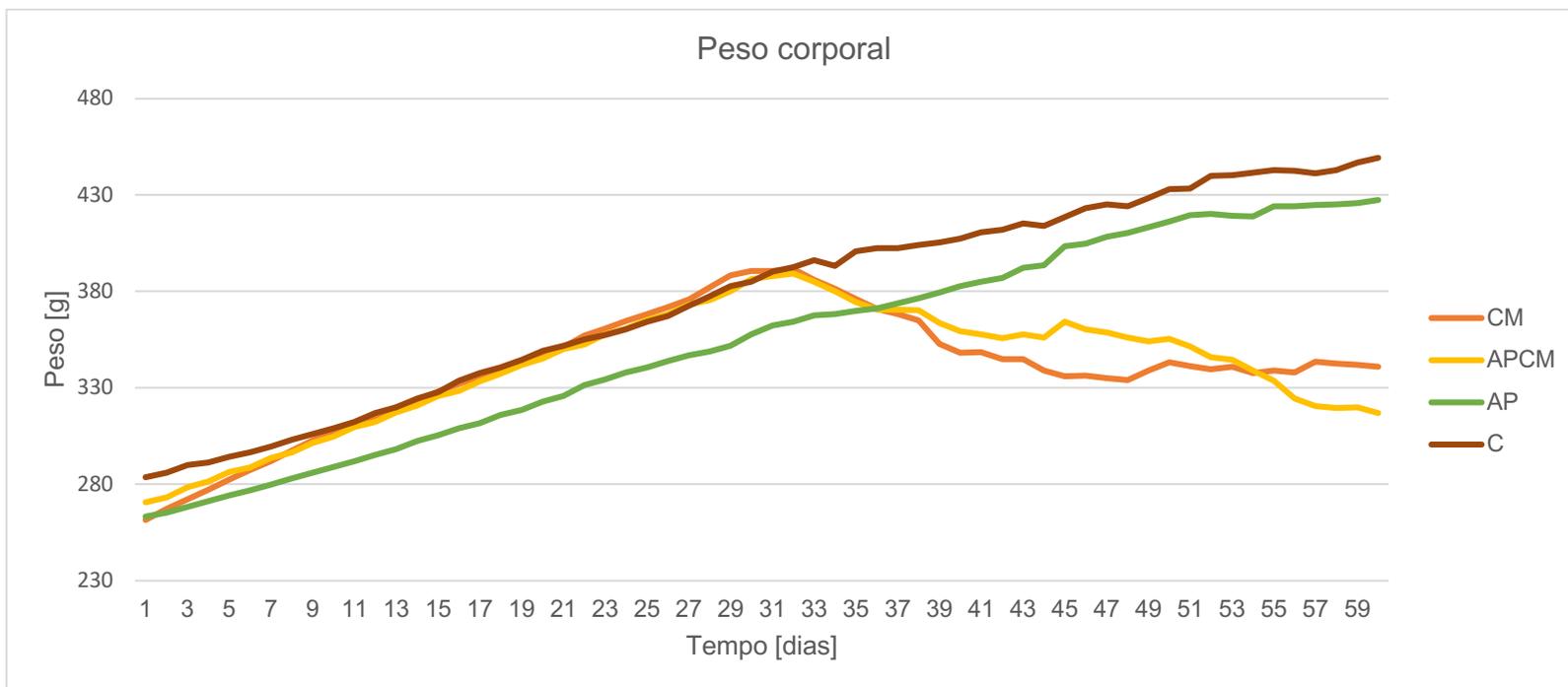
Fonte: A autora

### 5.1.2 Peso corporal dos animais

A figura 5.2 mostra o comportamento do peso corporal dos animais por grupo ao longo do estudo. O dia 1 corresponde ao dia em que foi feita a indução da periodontite apical crônica. O dia 30 foi o dia 1º da indução da cardiomiopatia. O dia 60 foi o dia da eutanásia dos animais.

Os grupos APCM e CM demonstraram aumento de peso até o 32º dia, e então, obtendo queda a partir deste momento. No grupo CM o peso começou a se manter mais estável e com leve aumento a partir do 47º dia, enquanto no grupo APCM a perda de peso manteve-se até o término do estudo. Os grupos AP e C tiveram aumento de peso constante durante todo o período experimental.

Figura 5.2 – Gráfico do comportamento do peso corporal por grupo. O gráfico mostra a o peso médio por dia em cada grupo. Grupo: CM: cardiomiopatia induzida; APCM: cardiomiopatia e periodontite apical crônica induzidas; AP: periodontite apical crônica induzida; C: controle.



Fonte: A autora

A tabela 5.2 mostra os dados descritivos sobre o peso médio dos animais por grupo no começo e no final do estudo.

Tabela 5.2 – Peso médio dos animais por grupo

Grupo	Peso médio	
	[g] inicial	[g] final
<b>CM</b>	261,5	332,25
<b>APCM</b>	270,64	327
<b>AP</b>	263,27	435,7
<b>C</b>	283,6	453

Fonte: A autora

As médias e desvios padrões das diferenças médias do peso corporal por grupo são mostradas na tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Diferença de peso dos animais por grupo

Grupo	Diferença de peso médio [g]
<b>CM</b>	70,75 ± 32.2014 <sup>A</sup>
<b>APCM</b>	56.1176 ± 29.4679 <sup>A</sup>
<b>AP</b>	172 ± 17.3205 <sup>B</sup>
<b>C</b>	169.7273 ± 25.9348 <sup>B</sup>

*Letras maiúsculas diferentes em cada coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais*

*ANOVA 1 fator, post hoc Bonferroni; p<.05*

Fonte: A autora

O tratamento com DOX reduziu o aumento do peso corporal nos animais nos grupos tratados, CM e APCM, redução estatisticamente significativa quando

comparados com os grupos AP e C. A diferença do peso entre os grupos CM e APCM e entre o AP e C não tiveram significância estatística.

### **5.1.3 Alteração da atividade motora**

A partir do 5º dia da indução de cardiomiopatia, os animais dos grupos CM e APCM apresentaram progressivamente piloereção, movimentação mais lenta, pouca força (percebida no momento em que eram contidos para as injeções e/ou deslocamento dos animais desde a gaiola até a balança e/ou gaiola nova) e ocasionalmente tremidos.

Os animais dos grupos AP e C não apresentaram nenhuma alteração da atividade motora nem piloereção.

### 5.1.4 Peso dos corações

A tabela 5.4 mostra as médias e desvios padrões do peso dos corações dos animais por grupo.

Tabela 5.4 – Peso dos corações por grupo

<b>Grupo</b>	<b>Peso médio dos corações [g]</b>
<b>CM</b>	1,06 ± 0,2 <sup>A</sup>
<b>APCM</b>	1,1 ± 0,16 <sup>A</sup>
<b>AP</b>	1,3 ± 0,08 <sup>B</sup>
<b>C</b>	1,28 ± 0,05 <sup>A,B</sup>

*Letras maiúsculas diferentes em cada coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais*

*ANOVA 1 fator, post hoc Bonferroni; p<.05*

Fonte: A autora

O peso dos corações no grupo CM foi menor que nos outros grupos, mas somente com diferença significativa ao grupo AP. O grupo APCM teve menor peso com respeito ao grupo AP e C, mas a diferença só foi estatisticamente significativa ao grupo AP. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos CM e APCM e entre o AP e C.

## 5.2 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A tabela 5.5 mostra as médias e desvios padrões obtidos na análise do estresse oxidativo e da atividade das enzimas antioxidantes.

A peroxidação lipídica (MDA) aumentou significativamente no grupo APCM em relação a todos os outros grupos ( $p < .05$ ), enquanto o aumento do grupo CM foi estatisticamente significativo ( $p < .05$ ) ao grupo AP, mas o aumento não teve diferença estatística quando comparado com o grupo controle ( $p > .05$ ). Observa-se que o grupo controle teve maiores valores que o grupo AP, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p > .05$ ).

O maior valor da atividade da enzima GPx foi maior no grupo CM, que teve diferença significativa em relação aos grupos APCM e C ( $p < .05$ ). O menor valor foi no grupo APCM, que foi estatisticamente significativo aos grupos CM e AP ( $p < .05$ ). A diferença entre os grupos AP e C não teve significância estatística ( $p > .05$ ).

A maior atividade da enzima CAT foi no grupo CM, cujo aumento foi estatisticamente significativo em relação a todos grupos ( $p < .05$ ); a atividade da enzima CAT no grupo APCM foi maior que nos grupos AP e controle, mas sem diferença estatisticamente significativa ( $p > .05$ ); a menor atividade da enzima CAT no grupo controle só teve diferença estatística com o grupo CM ( $p < .05$ ).

A atividade da enzima SOD foi maior no grupo CM, sendo estatisticamente significativa em relação aos grupos APCM e controle ( $p < .05$ ). O menor valor da atividade da enzima SOD foi no grupo controle, mas este valor foi estatisticamente significativo somente com o grupo CM ( $p < .05$ ).

Tabela 5.5 – Biomarcadores de estresse oxidativo

	<b>MDA [mg/lt]</b>	<b>GPx [U/mg prot]*</b>	<b>CAT [U/mg prot]</b>	<b>SOD [U/mg prot]</b>
<b>CM</b>	102.6374 ± 9.3085 <sup>A</sup>	13,8295 ± 4,6039 <sup>A</sup>	8.634 ± 1.8581 <sup>A</sup>	0.127± 0.0257 <sup>A</sup>
<b>APCM</b>	154.6837 ± 40.6737 <sup>B</sup>	3,1316 ± 0,8019 <sup>B</sup>	5.288 ± 1.3985 <sup>B</sup>	0.0742 ± 0.0197 <sup>B</sup>
<b>AP</b>	62.9891 ± 5.6583 <sup>C</sup>	11,7365 ± 1,7834 <sup>A, C</sup>	3.8812 ± 1.1928 <sup>B</sup>	0.1054 ± 0.0346 <sup>A,B</sup>
<b>C</b>	76.9124 ± 16.1195 <sup>A,C</sup>	7,7114 ± 1,9229 <sup>B,C</sup>	3.4889 ± 1.5039 <sup>B</sup>	0.0627 ± 0.0236 <sup>B</sup>

*Letras maiúsculas diferentes em cada coluna indicam diferença significativa entre os grupos experimentais*

*ANOVA 1 fator, post hoc Bonferroni; p<.05*

*\* x10<sup>-2</sup>*

Fonte: A autora



## 6 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar se a periodontite apical crônica influencia no desenvolvimento de cardiomiopatia o qual foi analisado por meio da quantificação do estresse oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes no tecido cardíaco. Para atingir o presente objetivo foi avaliado se a periodontite apical crônica aumenta o estresse oxidativo nos ventrículos cardíacos em ratos com e sem cardiomiopatia induzida e se a periodontite apical crônica modifica a atividade das enzimas do complexo antioxidante nos ventrículos cardíacos dos ratos com e sem cardiomiopatia induzida.

As cardiomiopatias são doenças do músculo cardíaco resultantes de uma série de agressões (defeitos genéticos, lesão ao cardiomiócito ou infiltração do tecido miocárdico). As cardiomiopatias, portanto, resultam de agressões a elementos celulares do coração, particularmente o miócito cardíaco, e a processos extracelulares, como a deposição de substâncias anormais na matriz extracelular. As cardiomiopatias são definidas de forma tradicional com base em fenótipos estruturais e funcionais. São classificadas como dilatada (caracterizada por dilatação da câmara ventricular e redução no desempenho cardíaco), hipertrófica (espessamento e hipertrofia das paredes ventriculares e aumento do desempenho cardíaco) e restritiva (paredes ventriculares espessas e rígidas que impedem o enchimento diastólico do ventrículo; o desempenho cardíaco sistólico é próximo ao normal). O fenótipo de cardiomiopatia dilatada (CMD) é o mais comum e, com frequência, visto como uma “via final comum” de vários tipos de agressão miocárdica. A CMD é a dilatação de um ou dos dois ventrículos que leva a disfunção sistólica. Normalmente a dilatação da câmara precede sinais e sintomas de insuficiência cardíaca congestiva. É uma apresentação clínica importante e frequente. Não é possível identificar a base etiológica em 50% ou mais dos pacientes com CMD e, nesse caso, o paciente é rotulado como portador de CMD idiopática (Braunwald, 2013).

O histórico natural da CMD não é bem estabelecido pois o diagnóstico contém diversas causas, e os pacientes se apresentam de formas bastante diversas. Eles podem apresentar desde uma disfunção ventricular esquerda assintomática até uma insuficiência cardíaca congestiva leve, moderada ou grave (Pontes et al., 2010; Braunwald, 2013).

Neste trabalho, a cardiomiopatia nos grupos CM e APCM foi induzida mediante a administração de DOX numa dose acumulativa de 12,5 mg/kg. O mecanismo pelo qual a DOX causa cardiomiopatia é controverso (Lagoa et al., 2014; Medeiros-Lima et al., 2019), mas a teoria mais aceita é que o mecanismo molecular responsável pela indução de cardiomiopatia é o estresse oxidativo induzido por radicais livres (Julicher et al., 1986; Li et al., 2002; Lagoa et al., 2014; Medeiros-Lima et al., 2019) cujo o aumento estimula processos como a peroxidação lipídica (Thayer, 1988). Os principais produtos estáveis da peroxidação lipídica, aldeídos saturados e insaturados, são considerados alguns dos poucos parâmetros mensuráveis indicativos de peroxidação lipídica in vivo (Luo et al., 1997). A formação de malondialdeído (MDA), um produto tóxico da decomposição de peróxidos lipídicos, tem sido demonstrada nos corações de ratos tratados com DOX, sugerindo que a peroxidação lipídica está envolvida na cardiotoxicidade da DOX (Thayer, 1988; Luo et al., 1997). A estrutura desta antraciclina tem potencial reativo altíssimo, resultando na formação de um radical livre de semiquinona; sob as condições aeróbias das células miocárdicas, esta semiquinona pode doar seu elétron não emparelhado ao oxigênio molecular para produzir o radical superóxido, que é um iniciador potente de outros radicais de oxigênio, assim como também de espécies reativas de oxigênio (ROS). A repetitiva redução e oxidação (conhecida como ciclo redox) da DOX geram radicais semiquinona, oxigênio singlete, superóxido e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Os radicais livres, especialmente o radical hidroxila altamente reativo, reagem prontamente com uma variedade de moléculas e causam peroxidação dos lipídios da membrana, resultando em danos na membrana, danos nas proteínas (incluindo a inativação de varias enzimas) e no DNA, e na indução de reações inflamatórias que levam ao aumento da síntese de moléculas de adesão e citocinas, infiltração de neutrófilos e macrófagos e morte necrótica ou apoptótica das células cardíacas (Luo et al., 1997; Li et al., 2002; Medeiros-Lima et al., 2019).

Em concordância com estudos anteriores que utilizaram DOX para induzir CMD (Richard et al., 2011; Anghel et al., 2018; Medeiros-Lima et al., 2019; Sahu et al., 2019), o presente estudo mostrou um aumento do estresse oxidativo nos corações dos ratos do grupo CM e APCM quando comparados aos corações dos ratos dos grupos restantes, embora neste estudo a significância estatística ( $p < .05$ ) foi encontrada entre o grupo CM e AP e não entre o CM e o controle, muito provavelmente devido ao menor número de animais deste último grupo. No caso do grupo APCM, foram obtidos valores significativamente maiores de estresse oxidativo quando comparados aos corações dos ratos dos grupos restantes ( $p < .05$ ); isto pode ser explicado pela participação de todo um processo inflamatório no coração com CMD que é piorado pela disseminação à distância do processo inflamatório e de estresse oxidativo local presente nos casos de AP.

Os resultados do estudo de Richard et al. (2011) fornecem evidências diretas de que o tecido adventício das artérias coronárias ventriculares pode ser afetado pela DOX, sendo este tecido uma fonte de mediadores inflamatórios; estes resultados estão de acordo com evidencia anterior (Takemura; Fujiwara, 2007) que relatam alterações morfológicas que podem estar relacionadas a edema e inflamação, portanto, pode existir a influencia da liberação de mediadores e hormônios vasoativos na patogênese deste tipo de cardiomiopatia (Richard et al., 2011). Ademais, a PCR, que é uma proteína de fase aguda, tem sido encontrada expressa em cardiomiócitos, células endoteliais e células endoteliais microvasculares em pacientes com CMD. Esta proteína pode induzir injúria miocárdica ativando o sistema complemento e induzindo a quimiotaxia de leucócitos. Em pacientes com CMD, a PCR elevada tem sido associada a inflamação e insuficiência cardíaca (Shen et al., 2016). Shen et al. (2016) observaram em seu estudo que esta proteína se encontra aumentada significativamente nos ratos com cardiomiopatia dilatada.

Sob o ponto de vista endodôntico, ainda que as infecções periapicais causem numerosas respostas teciduais locais com o propósito de limitar a disseminação do processo infeccioso, a AP pode não ser um fenômeno exclusivamente local. A interação entre o LPS das bactérias anaeróbias gram negativas com receptores do

tipo Toll-4 nos macrófagos e neutrófilos, ativa o amplo eixo da imunidade inata, regulando positivamente citocinas pró-inflamatórias como IL-1b, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e PGE<sub>2</sub>, as quais podem ser liberadas na circulação sistêmica induzindo ou perpetuando um status inflamatório crônico sistêmico elevado (Segura-Egea et al., 2015).

Vários tipos de estudos encontraram associações entre saúde sistêmica e doença periodontal (DP), assim, ela tem sido associada a diabetes mellitus (Ribeiro et al., 2016; Cintra et al., 2017), aterosclerose (Engebretson et al., 2005; Soder et al., 2005; Aarabi et al., 2015; Aarabi et al., 2018), doença arterial coronária (DAC) (Mattila et al., 1995; Oikarinen et al., 2009), infarto agudo do miocárdio (Mattila et al., 1989; Willershausen et al., 2009), rigidez arterial (Schmitt et al., 2015), arritmias (Yu et al., 2010; Aoyama et al., 2017), hipertensão arterial (Leong et al., 2014; Ribeiro et al., 2016), baixo peso ao nascer (Newman, 1996), parto prematuro (Newman, 1996), entre outras (Overholser et al., 1988; Segura-Egea et al., 2015). Existe pouca evidência na área da endodontia (Caplan et al., 2009; Segura-Egea et al., 2015; Liljestrang et al., 2016), mas algum conhecimento da periodontia pode ser extrapolado à endodontia (Liljestrang et al., 2016), pois processos inflamatórios periodontais e endodônticos crônicos possuem três semelhanças importantes que, de acordo com Segura-Egea et al. (2015), são: 1) ambas são infecções crônicas da cavidade oral, 2) as duas são infecções polimicrobianas que compartilham uma microbiota com predominância de bactérias anaeróbias gram negativas e 3) níveis elevados de citocinas podem ser liberadas sistemicamente em processos agudos e crônicos de as duas doenças, por exemplo, concentrações elevadas de mediadores inflamatórios têm sido detectados no fluido crevicular gengival de pacientes com DP e nos tecidos periapicais de dentes com AP. A forma em que as reações inflamatórias e patogênicas continuam a nível sistêmico pode ser mediante 3 possíveis mecanismos que permitem a passagem de bactérias e seus produtos ao resto do corpo: 1) bacteremia: microrganismos que não são removidos entram na circulação sanguínea, disseminando-se 2) dano metastático: causado pela liberação de endotoxinas que são letais para as células e 3) inflamação metastática: causada por reações antígeno-anticorpo e liberação de mediadores químicos (Cotti et al., 2011b; Segura-Egea et al., 2015). Neste sentido, estudos prévios têm demonstrado que mecanismos inflamatórios subjacentes podem levar o indivíduo a ter alto risco

de desenvolver doenças periodontais e sistêmicas iniciando-as ou exacerbando-as (Beck et al., 1996; Beck et al., 1998; Gendron et al., 2000; Li et al., 2000; Mattila et al., 2005; Schenkein; Loos, 2013; Cintra et al., 2017).

A evidência mostra que os indivíduos com AP têm níveis maiores de IL-2 sérica que os pacientes saudáveis, ela está envolvida na resposta imune celular e é considerada como uma citocina pró-inflamatória secretada pelos linfócitos Th1, que estimula sua expansão clonal. Esta citocina resulta um marcador útil na atividade patológica inflamatória em doenças sistêmicas. A IL-2 é parte da rede de citocinas ativadas na polpa e no periápice em resposta à infecção, ela é crucial para limitar a disseminação de bactérias e seus produtos, por outro lado as células T-helper têm mostrado ser o tipo celular predominante envolvido no desenvolvimento de lesão periapical (Cotti et al., 2015). As ROS são altamente reativas, e intermediam reações fisiológicas envolvidas no controle de importantes processos vitais. Elas desencadeiam reações de propagação que podem resultar em danos oxidativos. Altas concentrações de ROS, como observadas na hipertensão, hipercolesterolemia, diabetes, alteram várias funções do endotélio vascular e mediam várias vias de sinalização inflamatória na aterogênese (Gurav, 2014; Cotti et al., 2015). Estudos recentes (Brilhante Wolle et al., 2012; Cotti et al., 2015; Hernandez-Rios et al., 2017) têm reportado que pacientes com AP mostram níveis mais altos de estresse oxidativo sistêmico quando comparados a controles saudáveis, e que o estresse oxidativo retorna rapidamente a níveis normais depois do tratamento endodôntico. A sobreprodução de IL-2 e ROS como resultado da inflamação dental crônica e de estresse oxidativo, pode promover uma série de eventos negativos no sistema CV, mediante a oxidação celular e perturbação da homeostase vascular, levando à ativação de diversos componentes do sistema imune e participando das doenças CV (Cotti et al., 2015). Também, tem sido reportado que a produção de ROS está elevada em indivíduos diabéticos, principalmente em casos de controle deficiente da glicemia, ademais, existe evidência de que o estresse oxidativo na polpa dentária encontra-se aumentado em ratos com diabetes tipo 1 (Brilhante Wolle et al., 2012).

Se considerarmos, então, que em presença de AP ou DP os níveis sistêmicos de citocinas e de estresse oxidativo são maiores (Cintra et al., 2014b; Leong et al.,

2014) e que nos casos de presença de outras doenças sistêmicas estes níveis aumentam mais ainda (Cotti et al., 2011a; Cintra et al., 2014a; Cintra et al., 2014b; Leong et al., 2014; Kose et al., 2017), muito provavelmente estamos frente a uma disseminação metastática de produtos da inflamação que estariam afetando o tecido miocárdico piorando as condições da cardiomiopatia-induzida no grupo APCM, o que se viu refletido no tecido cardíaco deste grupo com aumento significativo da peroxidação lipídica em relação a todos os grupos ( $p < .05$ ). De acordo com o estudo de Kose et al. (2017) que avaliaram os efeitos da DP na estrutura do tecido cardíaco, observaram através de imunistoquímica e histopatologia que a periodontite provoca efeitos crônicos iniciais degenerativos no tecido ventricular provocando mudanças hipertróficas, o que suporta mais ainda a ideia do efeito direto que pode ter tido a AP no tecido cardíaco no grupo APCM.

O corpo possui defesas elaboradas para evitar lesões causadas pela peroxidação lipídica induzida por radicais livres. As moléculas endógenas antioxidantes são a primeira linha de defesa celular contra o estresse oxidativo (Sahu et al., 2019). Os sistemas enzimáticos que funcionam com essa capacidade incluem catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e vários sequestradores de radicais livres, como glutathione (GSH), vitaminas E e A, etc. (Luo et al., 1997). Com base no princípio da hormesia, um aumento no estresse oxidativo, teoricamente, levaria ao aumento na defesa antioxidante (Medeiros-Lima et al., 2019). Mas sabe-se também que os antioxidantes endógenos críticos e suas atividades para desintoxicar esses radicais são deprimidos no miocárdio lesado devido a tratamentos com DOX (Li et al., 2002). Têm sido demonstrado que doenças metabólicas tais como diabetes levam a alterações no sistema antioxidante nas polpas dentárias de ratos (Brilhante Wolle et al., 2012).

O maior valor da atividade da enzima GPx foi no grupo CM, que teve significância estatística em relação aos grupos APCM e C ( $p < .05$ ), o nível aumentado de atividade desta enzima cardíaca pode refletir uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo, resultados de acordo a trabalhos anteriores (Thayer, 1988; Medeiros-Lima et al., 2019). Com respeito a enzima CAT, a maior atividade foi encontrada no grupo CM, cujo aumento foi estatisticamente significativo em relação a todos grupos ( $p < .05$ ). Este aumento da atividade paralela ao aumento

da peroxidação lipídica sugere uma resposta celular para neutralizar a maior produção de  $H_2O_2$  nos corações destes ratos (Lagoa et al., 2014). A atividade da enzima CAT no grupo APCM foi maior com relação aos grupos AP e o controle, mas sem diferença estatisticamente significante ( $p > .05$ ). A atividade da CAT praticamente não teve mudanças ao comparar os grupos AP e C, isto pode ser explicado porque o coração tem relativamente baixos níveis de CAT comparados com outros tecidos, e ela pode desempenhar um papel menor na defesa das células miocárdicas contra a injúria dos radicais livres (Li et al., 2002). Os valores maiores nos grupos com cardiomiopatia também foram encontrados em estudo prévio (Brilhante Wolle et al., 2012). A atividade da enzima SOD foi maior no grupo CM, sendo estatisticamente significante com os grupos APCM e controle ( $p < .05$ ).

O fato do grupo APCM apresentar menores valores da atividade das enzimas GPx (com significância estatística entre os grupos CM e AP ( $p < .05$ )), CAT ( $p < .05$  entre APCM e CM) e SOD ( $p < .05$  entre APCM e CM) quando comparado ao grupo CM, provavelmente pode ser devido o grupo APCM possuir maior depleção nos níveis das enzimas antioxidantes e/ou na inativação delas (Sahu et al., 2019) por causa de uma maior severidade do dano no miocárdio neste grupo, assim como sugere a análise do MDA feita. Não existe evidência na literatura que explique o mecanismo desta alteração direta nas enzimas antioxidantes cardíacas na presença de infecções endodônticas ou orais. Mas, de acordo com a literatura, a alteração da atividade das enzimas antioxidantes aumenta ainda mais o estresse oxidativo, e promove a progressão da cardiomiopatia (Sahu et al., 2019; Medeiros-Lima et al., 2019).

No que se refere à taxa de mortalidade dos animais, esta foi de 50% e 53% nos grupos CM e APCM, respetivamente. Esta alta mortalidade é comparável à observada em estudos anteriores que obtiveram percentuais entre 35% a 82% dos animais (Shen et al., 2016; O'Connell et al., 2017; Medeiros-Lima et al., 2019). A causa da mortalidade nesses casos, tem sido descrita como insuficiência cardíaca aguda, hemorragia grave do trato gastrointestinal ou morte cardíaca súbita de acordo ao exposto no trabalho de Shen et al. (2016), onde a metodologia utilizada foi semelhante à do presente estudo (variação de -0,5 mg/kg da dose total).

Os animais dos grupos CM e APCM tiveram diminuição do peso corporal quando comparados aos grupos AP e C ( $p < .05$ ), resultados concordantes com outros estudos (Brilhante Wolle et al., 2012; O'Connell et al., 2017; Anghel et al., 2018; Medeiros-Lima et al., 2019). A perda de peso pode ser atribuída à redução da ingestão de comida e inibição da síntese proteica devido ao efeito antineoplásico da droga como tem sugerido estudos prévios (Hayward; Hydock, 2007; Richard et al., 2011). Sinais de toxicidade como alteração da atividade motora e piloereção foram observadas neste trabalho assim como também em estudos prévios (Brilhante Wolle et al., 2012; O'Connell et al., 2017)

O peso dos corações foi menor nos grupos com cardiomiopatia, embora somente com significância estatística quando comparados com o grupo AP ( $p < .05$ ). No entanto, entre eles (CM e APCM), não foi encontrada diferença estatística. Outros estudos têm descrito este mesmo fenômeno, que sugere uma atrofia cardíaca que pode ser explicada pela apoptose de cardiomiócitos (Richard et al., 2011; Anghel et al., 2018; Medeiros-Lima et al., 2019), embora outros tenham obtido resultados opostos (Pontes et al., 2010).

No presente estudo o rato foi escolhido como animal de experimentação. Estudos comparativos de miocardiopatia demonstraram que o rato é o animal que desenvolve a CMD mais semelhante à desenvolvida no ser humano, suportando seu uso como modelo de estudo desta doença (Pontes et al., 2010). O uso de DOX leva a danos cardíacos tradicionalmente aceitos como lesão do tipo I, caracterizada por disfunção cardíaca permanente e irreversível (Balazs; Herman, 1976; Medeiros-Lima et al., 2019). O uso de rato provou ser um modelo bem aceito, confiável e econômico para investigar a farmacologia do DOX e possíveis tratamentos para aliviar sua cardiotoxicidade (Mettler et al., 1977; Hayward; Hydock, 2007).

O protocolo de indução da cardiomiopatia utilizado no presente estudo tem demonstrado ser um modelo efetivo induzindo mudanças histológicas no miocárdio (Pontes et al., 2010; O'Connell et al., 2017), disfunção cardíaca e cardiotoxicidade severa (Hayward; Hydock, 2007; Anghel et al., 2018). O efeito da DOX é dose-dependente (Li et al., 2002). A escolha da dose de 12,5 mg/kg num protocolo de injeção de 5 injeções em 2 semanas foi devido aos seguintes motivos: estudos

relatam que já desde os 10 mg/kg apreciam-se mudanças precoces nas atividades das enzimas antioxidantes e na peroxidação lipídica (Li et al., 2002; Medeiros-Lima et al., 2019) sem o desconforto dos animais que é observado com doses superiores a 15 mg/kg (diarreia severa, ascites, maior mortalidade, etc.) (Hayward; Hydock, 2007). Embora maior disfunção cardíaca seja observada com doses  $\geq$  15 mg/kg (Hayward; Hydock, 2007) quando comparada à dose de 10 mg/kg, utilizou-se a dose de 12,5 mg/kg para conseguir uma maior disfunção cardíaca que a dose de 10 mg/kg, mas sem a alta quantidade de efeitos adversos que teriam sido observados quando uma dose de 15mg/kg ou mais é utilizada. No entanto, a dose utilizada estaria de acordo com a correlação clínica da dose acumulativa num paciente submetido ao tratamento com DOX (Hayward; Hydock, 2007). O protocolo de administração de várias injeções foi escolhido porque a administração da dose ao longo de dias ou semanas ao invés de uma injeção única, resulta em melhores taxas de sobrevivência e maiores sinais clássicos de cardiomiopatia dilatada, provavelmente devido ao maior período de exposição ao fármaco, intensificando os efeitos cardiotóxicos (Hayward; Hydock, 2007; Shen et al., 2016)

No caso da indução da periodontite apical crônica, o modelo está bem estabelecido em animais tais como cães (Torneck; Tulananda, 1969; Tanomaru et al., 2008a; Tanomaru et al., 2008b; Tanomaru-Filho et al., 2009), macacos (Walton; Ardjmand, 1992), ratos, entre outros. Vários estudos em ratos têm comprovado que a exposição da cavidade pulpar ao ambiente oral provoca contaminação do tecido pulpar com a posterior necrose e desenvolvimento de periodontite apical, com tempo de exposição que varia de 1 a 180 dias (Burstone; Levy, 1950; Kakehashi et al., 1965; Yamasaki et al., 1994; Daniel et al., 2002; Iwama et al., 2003; Armada-Dias et al., 2006). Trinta dias é o tempo médio em que se têm visto o desenvolvimento de lesão periapical, ainda que fosse numa fase inicial (Yamasaki et al., 1994; Iwama et al., 2003; Armada-Dias et al., 2006), portanto esse foi o tempo escolhido para assim começar a indução da cardiomiopatia. Por outro lado, não foram inoculadas bactérias no espaço pulpar e a cavidade também não foi fechada; o motivo disto é que se deixou exposto ao meio oral para assim permitir o estabelecimento da lesão do jeito em que aconteceria normalmente.

Ainda não se tem evidência que explique completamente os mecanismos biológicos que vinculam as infecções orais com doenças CV (Nagpal et al., 2015; Beck et al., 2019; Liu et al., 2020). Isto é preocupante, pois a inquietude vem desde muito tempo atrás, e pouco tem se evoluído até hoje. Desde o final do século XIX, as infecções orais tomaram importância, considerando a cavidade oral como um reservatório de diversos germes patógenos que podiam causar doenças no corpo com causa “aparentemente desconhecida” (Miller, 1891). Poucos anos depois, outros autores (Hunter, 1900; Billings, 1912) descreveram que as infecções purulentas (abscessos gengivais, alveolite, infecções das cavidades paranasais, etc.) não ficam restritas a seus locais de origem. Posteriormente, a chamada “teoria da infecção focal” ficou esquecida e rejeitada nos anos 70, devido a insuficiente evidência científica (Newman, 1996; Ehrmann, 1972) e também ao advento do tratamento médico e odontológico moderno (Bansal et al., 2013), embora alguns pesquisadores daquela época (Rogers, 1976) tenham continuado atribuindo-lhe importância e associando as bactérias orais à endocardite subaguda, embora o papel delas em outros locais era desconhecido. Foi só em 1996 que Newman (1996) reintroduziu oficialmente o conceito de infecção focal. Felizmente, nos anos recentes, o tema tem sido amplamente debatido, sendo estudadas as possíveis associações entre infecções crônicas e doenças sistêmicas, chegando a introduzir o conceito de “Medicina periodontal” (Pizzo et al., 2010; Bansal et al., 2013), e mais atualmente o conceito de “medicina endodôntica” (Segura-Egea et al., 2015). Isto é muito importante devido à alta prevalência e a mortalidade pelas doenças CV (Précoma et al., 2019), pelo qual o entendimento dos mecanismos envolvidos que as relacionam com as infecções orais e de compreender a importância do controle das infecções da nossa área podem ser determinantes para o melhor controle e manejo deste tipo de doença.

O trabalho do clínico está em controlar as infecções do SCR tentando evitar o desenvolvimento ou perpetuação da infecção endodôntica (Duarte ELB et al., 2003), trabalhando para conseguir um bom preparo químico cirúrgico, mesmo nas condições de anatomias altamente complexas como canais laterais, istmos ou irregularidades que muitas vezes existem no SCR (Busquin et al., 2015). Para isso é importante combinar um bom preparo com técnicas de desinfecção e medicação efetivas (Daniel et al., 2002; Machado et al., 2010; Machado et al., 2017) que nos

permitam atingir os menores níveis possíveis de contaminação dentro deste sistema desde que é sabido que é impossível conseguir um canal totalmente livre de bactérias (Nabeshima et al., 2011; Nabeshima et al., 2014; Guillen et al., 2018).

Seria interessante avaliar se o efeito da AP acontece nos primeiros momentos da indução da cardiomiopatia, já que evidência (Lagoa et al., 2014) sugere que a peroxidação lipídica e atividade antioxidante encontram-se elevadas significativamente desde o terceiro dia após a exposição à DOX. Ademais, tem sugerido que a presença de inflamação sistêmica muito antes da presença de doenças sistêmicas, provavelmente influenciando na patogênese propriamente dita (Cotti et al., 2011b; Petersen et al., 2014; Aarabi et al., 2015) participando como fatores de risco para esse tipo de doenças.

É muito importante elucidar se a AP representa somente um componente oral de uma doença sistêmica ou se compartilham uma etiologia comum (Cotti et al., 2011b; Bains; Bains, 2018) assim como também pensa-se que acontece com as doenças periodontais e as sistêmicas (Aarabi et al., 2015). Se considerarmos que as doenças endodônticas e periodontais compartilham muitos pontos em comum, é lógico pensar que os avanços do conhecimento na chamada “medicina periodontal” podem nos ajudar a entender e nos orientar a caminhar na mesma via de desenvolvimento do conhecimento na “medicina endodôntica”.



## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos dentro da metodologia utilizada, conclui-se que a periodontite apical crônica influencia no desenvolvimento de cardiomiopatia-induzida em ratos, através do aumento de estresse oxidativo e alteração da atividade das enzimas antioxidantes no tecido ventricular.



**REFERENCIAS<sup>1</sup>**

- Aarabi G, Eberhard J, Reissmann DR, Heydecke G, Seedorf U. Interaction between periodontal disease and atherosclerotic vascular disease--Fact or fiction?. *Atherosclerosis*. 2015 Aug;241(2):555-60.
- Aarabi G, Heydecke G, Seedorf U. Roles of Oral Infections in the Pathomechanism of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2018 Jul 6;19(7). pii: E1978. doi: 10.3390/ijms19071978.
- Anghel N, Herman H, Balta C, Rosu M, Stan MS, Nita D, et al. Acute cardiotoxicity induced by doxorubicin in right ventricle is associated with increase of oxidative stress and apoptosis in rats. *Histol Histopathol*. 2018 Apr;33(4):365-78. doi: 10.14670/HH-11-932.
- Aoyama N, Suzuki JI, Kobayashi N, Hanatani T, Ashigaki N, Yoshida A, et al. Detrimental effects of specific Periodontopathic bacterial infection on tachyarrhythmia compared to Bradyarrhythmia. *BMC Cardiovasc Disord*. 2017 Oct 17;17(1):267. doi: 10.1186/s12872-017-0703-2.
- Armada-Dias L, Breda J, Provenzano JC, Breitenbach M, Rôças I, Gahyva SM, et al. Development of periradicular lesions in normal and diabetic rats. *J Appl Oral Sci*. 2006 Oct;14(5):371-5.
- Bains R, Bains VK. Lesions of endodontic origin: An emerging risk factor for coronary heart diseases. *Indian Heart J*. 2018 Dec;70 Suppl 3:S431-S434. doi: 10.1016/j.ihj.2018.07.004.
- Balazs T, Herman EH. Toxic cardiomyopathies. *Ann Clin Lab Sci*. 1976 Nov-Dec;6(6):467-76.
- Bansal M, Rastogi S, Vineeth NS. Influence of periodontal disease on systemic disease: inversion of a paradigm: a review. *J Med Life*. 2013 Jun 15;6(2):126-30.
- Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal Disease and Cardiovascular Disease. *J Periodontol*. 1996 Oct; 67(10 Suppl):1123-37.
- Beck JD, Offenbacher S, Williams R, Gibbs P, Garcia R. Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease?. *Ann Periodontol*. 1998 Jul;3(1):127-41.
- Beck JD, Papapanou PN, Philips KH, Offenbacher S. Periodontal Medicine: 100 Years of Progress. *J Dent Res*. 2019 Sept;98(10):1053-62.
- Billings F. Chronic focal infections and their etiologic relations to arthritis and nephritis. *Arch Intern Med*. 1912 Apr;9(4):484-98.

---

<sup>1</sup> De acordo com estilo Vancouver

Braunwald E. Tratado de doenças cardiovasculares. 9ª ed. Maceri MA et al., tradutor. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013. 2200 p.

Brilhante Wolle CF, de Aguiar Zollmann L, Etges A, Vitalis GS, Leite CE, Campos MM. Effects of the antioxidant agent tempol on periapical lesions in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Endod*. 2012 Feb;38(2):191-5. doi: 10.1016/j.joen.2011.11.007.

Burstone MS, Levy BM. The production of experimental apical granulomata in the Syrian hamster. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1950 Jun;3(6):807-11.

Busquim S, Cunha RS, Freire L, Gavini G, Machado ME, Santos M. A micro-computed tomography evaluation of long-oval canal preparation using reciprocating or rotary systems. *Int Endod J*. 2015 Oct;48(10):1001-6. doi: 10.1111/iej.12398.

Caplan DJ, Pankow JS, Cai J, Offenbacher S, Beck JD. The relationship between self-reported history of endodontic therapy and coronary heart disease in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *J Am Dent Assoc*. 2009 Aug;140(8):1004-12.

Cintra LT, da Silva Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Narciso LG, Mogami Bomfim SR, et al. Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. *J Endod*. 2014a Aug;40(8):1139-44. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.034.

Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, de Lima VM, et al. Apical periodontitis and periodontal disease increase serum IL-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. *Clin Oral Investig*. 2014b Dec;18(9):2123-8. doi: 10.1007/s00784-014-1192-7.

Cintra LT, Samuel RO, Prieto AK, Sumida DH, Dezan-Junior E, Gomes-Filho JE. Oral health, diabetes, and body weight. *Arch Oral Biol*. 2017 Jan;73:94-9.

Cotti E, Dessi C, Piras A, Flore G, Deidda M, Madeddu C, et al. Association of endodontic infection with detection of an initial lesion to the cardiovascular system. *J Endod*. 2011a Dec;37(12):1624-9. doi: 10.1016/j.joen.2011.09.006.

Cotti E, Dessi C, Piras A, Mercurio G. Can a chronic dental infection be considered a cause of cardiovascular disease? A review of the literature. *Int J Cardiol*. 2011b Apr 1;148(1):4-10. doi: 10.1016/j.ijcard.2010.08.011.

Cotti E, Zedda A, Deidda M, Piras A, Flore G, Ideo F, et al. Endodontic infection and endothelial dysfunction are associated with different mechanisms in men and women. *J Endod*. 2015 May;41(5):594-600. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.037.

Daniel RLD'ÁP. Análises radiográfica e microscópica do processo de reparo de lesões periapicais após o emprego de medicação intracanal em dentes de rato [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2002.

Duarte ELB, Souza ADS, Murgel CEF, Machado MEL. Avaliação do pós operatório de lesões periapicais tratadas com extravasamento de iodofórmio. RGO. 2003 Oct;51(4):225-8.

Ehrmann EH. Are dead teeth a health hazard?. Med J Aust. 1972 Apr;1(18):931-5.

Engelbreton SP, Lamster IB, Elkind MS, Rundek T, Serman NJ, Demmer RT, et al. Radiographic measures of chronic periodontitis and carotid artery plaque. Stroke. 2005 Mar;36(3):561-6.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol. 1990;186:407-21.

Gendron R, Grenier D, Maheu-Robert L. The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections. Microbes Infect. 2000 Jul;2(8):897-906.

Guillen RE, Nabeshima CK, Caballero-Flores H, Cayon MR, Mercade M, Cai S, et al. Evaluation of the WaveOne Gold and One Shape New Generation in Reducing Enterococcus faecalis from Root Canal. Braz Dent J. 2018 May-Jun;29(3):249-53. doi: 10.1590/0103-6440201801910.

Gurav AN. The implication of periodontitis in vascular endothelial dysfunction. Eur J Clin Invest. 2014 Oct;44(10):1000-9. doi: 10.1111/eci.12322.

Hayward R, Hydock DS. Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: an in vivo characterization. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2007 Jul;46(4):20-32.

Hernández-Ríos P, Pussinen PJ, Vernal R, Hernández M. Oxidative Stress in the Local and Systemic Events of Apical Periodontitis. Front Physiol. 2017 Nov 1;8:869. doi: 10.3389/fphys.2017.00869.

Hunter W. Oral Sepsis as a Cause of Disease. Br Med J. 1900 Jul;2(2065):215-6.

Iwama A, Nishigaki N, Nakamura K, Imaizumi I, Shibata N, Yamasaki M, et al. The effect of high sugar intake on the development of periradicular lesions in rats with type 2 diabetes. J Dent Res. 2003 Apr;82(4):322-5.

Julicher RH, Sterrenberg L, Bast A, Riksen RO, Koomen JM, Noordhoek J. The role of lipid peroxidation in acute doxorubicin-induced cardiotoxicity as studied in rat isolated heart. J Pharm Pharmacol. 1986 Apr;38(4):277-82.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965 Sep;20:340-9.

Kose O, Arabaci T, Gedikli S, Eminoglu DO, Kermen E, Kizildag A, et al. Biochemical and histopathologic analysis of the effects of periodontitis on left ventricular heart tissues of rats. J Periodontal Res. 2017 Apr;52(2):176-85. doi: 10.1111/jre.12380.

Lagoa R, Gañán C, López-Sánchez C, García-Martínez V, Gutierrez-Merino C. The decrease of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity and increase of ROS production by NADPH oxidases are early biomarkers in doxorubicin cardiotoxicity. *Biomarkers*. 2014 Mar;19(2):142-53. doi: 10.3109/1354750X.2014.885084.

Leong XF, Ng CY, Badiah B, Das S. Association between hypertension and periodontitis: possible mechanisms. *ScientificWorldJournal*. 2014 Jan 8;2014:768237. doi: 10.1155/2014/768237.

Li T, Danelisen I, Singal PK. Early changes in myocardial antioxidant enzymes in rats treated with adriamycin. *Mol Cell Biochem*. 2002 Mar;232(12):19-26.

Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Oct;13(4):547-58.

Liljestrand JM, Mantyla P, Paju S, Buhlin K, Kopra KA, Persson GR, et al. Association of Endodontic Lesions with Coronary Artery Disease. *J Dent Res*. 2016 Nov;95(12):1358-65.

Liu XR, Xu Q, Xiao J, Deng YM, Tang ZH, Tang YL, et al. Role of oral microbiota in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2020 Mar 24;506:191-5. doi: 10.1016/j.cca.2020.03.033.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.

Luo X, Evrovsky Y, Cole D, Trines J, Benson LN, Lehotay DC. Doxorubicin-induced acute changes in cytotoxic aldehydes, antioxidant status and cardiac function in the rat. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Feb 27;1360(1):45-52.

Machado ME, Sapia LA, Cai S, Martins GH, Nabeshima CK. Comparison of two rotary systems in root canal preparation regarding disinfection. *J Endod*. 2010 Jul;36(7):1238-40. doi: 10.1016/j.joen.2010.03.012.

Machado MEL, Nabeshima CK, Caballero-Flores H, Elmadjian-Filho M, Duarte MAH, Odinola-Zapata R, et al. Instrument Design May Influence Bacterial Reduction During Root Canal Preparation. *Braz Dent J*. 2017 Sep-Oct;28(5):587-91. doi: 10.1590/0103-6440201701506.

Massa LF, Arana-Chavez VE. Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. *Eur J Oral Sci*. 2000 Feb;108(1):74-7.

Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen VV, Rasi VP, Kesäniemi YA, Syrjälä SL, et al. Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ*. 1989 Mar 25;298(6676):779-81.

Mattila KJ, Pussinen PJ, Paju S. Dental infections and cardiovascular diseases: a review. *J Periodontol*. 2005 Nov;76(11 Suppl):2085-8.

- Mattila KJ, Valtonen VV, Nieminen M, Huttunen JK. Dental infection and the risk of new coronary events: prospective study of patients with documented coronary artery disease. *Clin Infect Dis*. 1995 Mar;20(3):588-92.
- Medeiros-Lima DJM, Carvalho JJ, Tibirica E, Borges JP, Matsuura C. Time course of cardiomyopathy induced by doxorubicin in rats. *Pharmacol Rep*. 2019 Aug;71(4):583-90. doi: 10.1016/j.pharep.2019.02.013.
- Mettler FP, Young DM, Ward JM. Adriamycin-induced cardiotoxicity (cardiomyopathy and congestive heart failure) in rats. *Cancer Res*. 1977 Aug;37(8 Pt 1):2705-13.
- Miller WD. The human mouth as a focus of infection. *The Lancet*. 1891 Aug;138(3546):340-2.
- Nabeshima CK, Caballero-Flores H, Cai S, Aranguren J, Borges Britto ML, Machado ME. Bacterial removal promoted by 2 single-file systems: Wave One and One Shape. *J Endod*. 2014 Dec;40(12):1995-8. doi: 10.1016/j.joen.2014.07.024.
- Nabeshima CK, Machado ME, Britto ML, Pallotta RC. Effectiveness of different chemical agents for disinfection of gutta-percha cones. *Aust Endod J*. 2011 Dec;37(3):118-21. doi: 10.1111/j.1747-4477.2010.00256.x.
- Nabeshima CK. Análise do efeito do fator de crescimento endotelial na angiogênese em canais de dentes de ratos com apicigênese completa [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015.
- Nagpal R, Yamashiro Y, Izumi Y. The Two-Way Association of Periodontal Infection with Systemic Disorders: An Overview. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:793898. doi: 10.1155/2015/793898.
- Newman HN. Focal infection. *J Dent Res*. 1996 Dec;75(12):1912-9.
- Nogueira FN. Sistema antioxidante e peroxidação lipídica em glândulas salivares de ratos diabéticos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2004.
- O'Connell JL, Romano MM, Campos Pulici EC, Carvalho EE, de Souza FR, Tanaka DM, et al. Short-term and long-term models of doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats: A comparison of functional and histopathological changes. *Exp Toxicol Pathol*. 2017 Apr 4;69(4):213-219. doi: 10.1016/j.etp.2017.01.004.
- Oikarinen K, Zubaid M, Thalib L, Soikkonen K, Rashed W, Lie T. Infectious dental diseases in patients with coronary artery disease: an orthopantomographic case-control study. *J Can Dent Assoc*. 2009 Feb;75(1):35.
- Overholser CD, Moreillon P, Glauser MP. Experimental endocarditis following dental extractions in rats with periodontitis. *J Oral Maxillofac Surg*. 1988 Oct;46(10):857-61.

Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal Biochem.* 1986 May 1;154(2):536-41.

Petersen J, Glaß EM, Nasser P, Crismani A, Luger AK, Schoenherr E, Bertl K, Glodny B. The association of chronic apical periodontitis and endodontic therapy with atherosclerosis. *Clin Oral Investig.* 2014 Sep;18(7):1813-23. doi: 10.1007/s00784-013-1156-3.

Pizzo G, Guiglia R, Lo Russo L, Campisi G. Dentistry and internal medicine: from the focal infection theory to the periodontal medicine concept. *Eur J Intern Med.* 2010 Dec;21(6):496-502. doi: 10.1016/j.ejim.2010.07.011.

Pontes JC, Gomes Júnior JF, Silva GV, Benfatti RA, Dias AE, Duarte JJ, Gardenal N, Odashiro M, Santos CH. Anatomopathological study of cardiomyopathy induced by doxorubicin in rats. *Acta Cir Bras.* 2010 Apr;25(2):137-43.

Précoma DB, de Oliveira GMM, Simão AF, Dutra OP, Coelho OR, Izar MO, et al. Updated Cardiovascular Prevention Guideline of the Brazilian Society of Cardiology - 2019. *Arq Bras Cardiol.* 2019 Nov 4;113(4):787-891. doi: 10.5935/abc.20190204.

Punchard N, Kelly F. *Free Radicals A Practical Approach.* 1<sup>a</sup> ed. Oxford: Oxford University Press; 1996. 310 p.

Ribeiro LS, Santos JN, Vieira CL, Caramelli B, Ramalho LM, Cury PR. Association of dental infections with systemic diseases in Brazilian Native Indigenous: a cross-sectional study. *J Am Soc Hypertens.* 2016 May;10(5):413-9. doi: 10.1016/j.jash.2016.02.012.

Richard C, Ghibu S, Delemasure-Chalumeau S, Guillard JC, Des Rosiers C, Zeller M, Cottin Y, Rochette L, Vergely C. Oxidative stress and myocardial gene alterations associated with Doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats persist for 2 months after treatment cessation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011 Dec;339(3):807-14. doi: 10.1124/jpet.111.185892.

Rogers AH. The oral cavity as a source of potential pathogens in focal infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1976 Aug;42(2):245-8.

Rosengren L, Winblad B. Periapical destructions caused by experimental pulpal inoculation of *Streptococcus mutans* in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1975 Mar;39(3):479-87.

Sahu R, Dua TK, Das S, De Feo V, Dewanjee S. Wheat phenolics suppress doxorubicin-induced cardiotoxicity via inhibition of oxidative stress, MAP kinase activation, NF- $\kappa$ B pathway, PI3K/Akt/mTOR impairment, and cardiac apoptosis. *Food Chem Toxicol.* 2019 Mar;125:503-519. doi: 10.1016/j.fct.2019.01.034.

Schenkein HA, Loos BG. Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. *J Periodontol.* 2013 Apr;84(4 Suppl):S51-69. doi: 10.1902/jop.2013.134006.

- Schmitt A, Carra MC, Boutouyrie P, Bouchard P. Periodontitis and arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2015 Nov;42(11):977-87. doi: 10.1111/jcpe.12467.
- Schnall PL, Dobson M, Landsbergis P. Globalization, Work, and Cardiovascular Disease. *Int J Health Serv*. 2016 Oct;46(4):656-92. doi: 10.1177/0020731416664687.
- Segura-Egea JJ, Martín-González J, Castellanos-Cosano L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. *Int Endod J*. 2015 Oct;48(10):933-51. doi: 10.1111/iej.12507.
- Shen LJ, Lu S, Zhou YH, Li L, Xing QM, Xu YL. Developing a rat model of dilated cardiomyopathy with improved survival. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2016 Dec.;17(12):975-83.
- Söder PO, Söder B, Nowak J, Jogestrand T. Early carotid atherosclerosis in subjects with periodontal diseases. *Stroke*. 2005 Jun;36(6):1195-200.
- Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis*. 2007 Mar-Apr;49(5):330-52.
- Tanomaru JM, Leonardo MR, Silva LA, Poliseli-Neto A, Tanomaru-Filho M. Histopathological evaluation of different methods of experimental induction of periapical periodontitis. *Braz Dent J*. 2008a;19(3):238-44.
- Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, da Silva LA, Ito IY. Microbial distribution in the root canal system after periapical lesion induction using different methods. *Braz Dent J*. 2008b;19(2):124-9.
- Tanomaru-Filho M, Jorge EG, Duarte MA, Gonçalves M, Guerreiro-Tanomaru JM. Comparative radiographic and histological analyses of periapical lesion development. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Mar;107(3):442-7. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.12.009.
- Thayer WS. Evaluation of tissue indicators of oxidative stress in rats treated chronically with adriamycin. *Biochem Pharmacol*. 1988 Jun 1;37(11):2189-94.
- Torneck CD, Tulananda N. Reaction of alveolar bone and cementum to experimental abscess formation in the dog. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1969 Sep;28(3):404-16.
- Walton RE, Ardjmand K. Histological evaluation of the presence of bacteria in induced periapical lesions in monkeys. *J Endod*. 1992 May;18(5):216-27.
- Willershausen B, Kasaj A, Willershausen I, Zahorka D, Briseño B, Blettner M, Genth-Zotz S, Münzel T. Association between chronic dental infection and acute myocardial infarction. *J Endod*. 2009 May;35(5):626-30. doi: 10.1016/j.joen.2009.01.012.

Yamasaki M, Kumazawa M, Kohsaka T, Nakamura H, Kameyama Y. Pulpal and periapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats. *J Endod.* 1994 Jan;20(1):13-7.

Yu G, Yu Y, Li YN, Shu R. Effect of periodontitis on susceptibility to atrial fibrillation in an animal model. *J Electrocardiol.* 2010 Jul-Aug;43(4):359-66. doi: 10.1016/j.jelectrocard.2009.12.002.

## ANEXO – Parecer do Comitê de Ética no uso de animais (CEUA)



Fundada em 1900  
*"Em constante busca da excelência"*

## UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Tel. (11) 3091 7842  
 ceuafou@usp.br

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: "Influência da Periodontite Apical Crônica no desenvolvimento de Cardiomiopatia mediante avaliação do NT-proBNP e radicais oxigenados em ratos" registrada com o nº 003/2019, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Manoel Eduardo de Lima Machado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica 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 Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 18/03/2019.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/04/2019 a 01/01/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico Wistar
Nº de animais	42
Peso/Idade	260+-20g
Sexo	42 Machos
Origem	Biotério/ FOU SP

São Paulo, 27 de março de 2019.

Profa. Associada Dra. Silvia Vanessa Lourenço  
 Coordenadora do CEUA-FOUSP

