

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA

CAUANA OLIVA TAVARES

**RELAÇÃO ENTRE PERIODONTITE APICAL, MICROBIOTA INTESTINAL E
ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM RATOS: DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES**

Porto Alegre

2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

NÍVEL: DOUTORADO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA

CAUANA OLIVA TAVARES

**RELAÇÃO ENTRE PERIODONTITE APICAL, MICROBIOTA INTESTINAL E
ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM RATOS: DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES**

Porto Alegre 2017

CAUANA OLIVA TAVARES

**RELAÇÃO ENTRE PERIODONTITE APICAL, MICROBIOTA INTESTINAL E
ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM RATOS: DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES**

Linha de pesquisa: Etiopatogênese e tratamento das doenças periodontais e periapicais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração de Endodontia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Martha Campos

Porto Alegre

2017

CAUANA OLIVA TAVARES

**RELAÇÃO ENTRE PERIODONTITE APICAL, MICROBIOTA INTESTINAL E
ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM RATOS: DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração de Endodontia.

Aprovada em: 18 de DEZEMBRO de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Martha Campos

Profa. Dra. Roberta Kochenborger Scarparo

Prof. Dr. João Batista Blessman Webber

Prof. Dr. André Arigony Souto

Profa. Dra. Helena Fetter Filippini

Profa. Dra. Daiana Elisabeth Bottcher (Suplente)

Dedicatória

Dedico aos amantes da vida,
pois sem inflamação não há emoção!

Ela é a própria Odisseia

Lá vem a *Ciência*, toda cheia de graça. Atormenta, inquieta, instiga a imaginação por onde passa. Quanto mistério! Quem escolhe a presença dela se entusiasma com facilidade.

Cheia de cores vibrantes, é a própria natureza em movimento, é tempestade de conhecimento. Quanta beleza! Ó céus, ela mata mesmo de curiosidade. Quando menos se espera, ela já jogou o charme da paixão. Ela é do dia e da noite. Da filosofia, da biologia, da matemática. Ela orgulha-se de quem abre o coração e não tem medo das perguntas.

Ela coleciona muitas histórias, aprendizados e está sempre pronta para uma nova aventura. Ela também está em paz com os erros porque sabe que fazem parte da jornada.

Ela não gosta de competir com os outros. Muito antes pelo contrário, gosta mesmo é de se unir em prol das descobertas que melhoram o mundo! Ela é organizada, tem foco, tem disciplina. Ela tem intenções honestas. Quem já viu ela se aproximar, sabe que ela conduz uma legião cativante e cheia de força. Ela sabe ser persuasiva e, de repente, tudo o que não vier dela se torna trivial, médio, clichê. Perde a graça. O bom mesmo é ir atrás dessa

tal *Ciência* com qualidade, profundidade, emoção! Ela é insinuante, provocante.

Obviamente ela não é fácil, e aí é que está mais uma de suas maiores virtudes: o desafio imposto. Não aceita qualquer um. Aqueles que têm preguiça, ela nem perde tempo.

Atropela com seu *infociclone*. Os que vão correndo atrás dela, ela foge, selvagem, voando.

Porém, aqueles que têm paciência, observam e persistem, ela deixa, no tempo dela, ser analisada, interpretada, adorada. Para os que mantêm a perspicácia, de uma hora para outra, ela abre um oceano de detalhes. E aí sim! É esse tipo de mente brilhando que ela aprecia. Quanta energia! Como ela gosta de ideias diferentes. Ela quer contribuição, quer senso crítico, quer criatividade, quer novidade. Ela quer paixão! Ela precisa dessa conexão.

Mas quem é o seu grande amor? Isso mesmo: o pesquisador!

Cauana, 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar desafios, por me dar forças para lutar pelos meus objetivos e pela capacidade de não desistir facilmente. Agradeço também pela oportunidade de interagir com pessoas que tem histórias e pontos de vista diferentes dos meus e, assim, aprender. Agradeço pelas pessoas maravilhosas que passaram no meu caminho e, também, por aquelas que permanecem.

Aos meus pais, Giancarlo Tavares e Máriam Georges Oliva, por me mostrar que com vontade, organização, paciência e respeito ao próximo posso realizar os meus sonhos. Vocês são meus exemplos de honestidade, força e superação. Meu amor por vocês é imenso.

Ao meu irmão, Gregório Oliva Tavares, que eu tenho tanto orgulho da pessoa que é. Sempre bondoso, sereno e confiante. Obrigada por me fazer acreditar que eu sou capaz, pelo companheirismo e pelo elo forte que nós temos. Tua maturidade e tua visão sobre a vida me fazem crescer. Obrigada pelos conselhos e risadas sobre coisas que só nós entendemos. Tu és meu porto-seguro para toda vida e meu amor por ti é inestimável.

Ao meu namorado, Lucas Santiago, que aterrissou no meu caminho no início deste último ano de doutorado. Apaixonado pela vida como eu, tu trouxeste ainda mais intensidade para os meus dias. Te agradeço os momentos incríveis que passamos juntos este ano. Obrigada também por me incentivar a manter a organização e a disciplina, entendendo que os momentos de foco são necessários. Que venham as nossas próximas alegrias e desafios! Te amo.

Às minhas avós, Irma Georges e Rosana Tavares. Cada uma a sua maneira, me ensinou que é preciso alimentar a mente e avançar. Duas mulheres fortes que, contrariando a sua época, se mantiveram ativas em suas profissões. Agradeço à vó Irma, que ainda mantém sua vivacidade irônica aos 90 anos, por cultivar meu intelecto e à vó Rosana por desenvolver minhas habilidades manuais, ambos tão importantes para o exercício da Odontologia.

À minha orientadora maravilhosa, Maria Martha Campos, pela incrível paciência e inestimável dedicação. Aprendi a te admirar ainda mais. Durante estes 4 anos, a montanha russa emocional da vida nos trouxe alegrias, surpresas e desafios. Sempre disposta a ajudar, almejando o crescimento dos teus alunos, contribuíste muito para minha formação acadêmica e intelectual. Entretanto, desta parceria, levo um aprendizado ainda mais valioso, o amadurecimento emocional. Não imaginas o quanto contribuíste para minha melhora como pessoa. Guardo com muito carinho os teus conselhos. Tenho muita admiração por ti e muito orgulho de ser tua orientada.

Ao meu eterno orientador e conselheiro, José Antônio Poli de Figueiredo. Ainda no mestrado, abriste uma porta dentro do meu ser que não se fechará nunca mais. Dentro desta porta estavam a reflexão, a curiosidade, a criatividade e o pensamento crítico, loucos para serem destrancados e aprimorados com o tempo. Teu olhar aberto e incentivador me dá coragem de “mergulhar” no conhecimento, “viajar” em ideias e “voar” pela ciência sem que seja uma obrigação. Agradeço,

também, por acreditares num mundo melhor através da educação. Tu és uma inspiração para mim.

À querida professora Roberta Kochenborger Scarparo, que me acompanha desde o curso de especialização. Obrigada por despertar em mim a vontade de seguir no meio acadêmico com o mestrado e o doutorado. Tu és muito especial.

À professora Fabiana Vieira Vier-Pelisser, que foi coordenadora da área de endodontia deste Programa de Pós-graduação. Obrigada pelos ensinamentos e por me acompanhar durante as reuniões do PPGO, no primeiro ano deste doutorado, quando eu fui representante discente.

A todos os colegas e funcionários do Instituto de Toxicologia e Farmacologia da PUCRS (INTOX), principalmente os doutorandos Rodrigo Braccini e Ana Paula Dagnino, por toda ajuda durante o período experimental deste doutorado e também por nossas conversas e risadas sobre a vida. Agradeço, ainda, à minha futura colega, Fernanda Letícia Rost, estudante da graduação em Odontologia desta universidade e bolsista de pesquisa, por toda ajuda. Vocês são demais! Sem vocês teria sido muito mais difícil.

Às minhas amigas do coração, Natália Dourado, Carolina Canabarro e Roberta Brochier, que desde o colégio me acompanham. Obrigada por estarem sempre dispostas a ajudar e pela vibração positiva com as minhas conquistas. Amo vocês.

Ao querido Lucas Hörlle, amigo que conheci no primeiro ano de faculdade, em 2005. Obrigada pelo teu coleguismo na profissão, por torcer pela minha felicidade e por ser esta pessoa maravilhosa que és. Nossa amizade é muito valiosa.

Às amigas e colegas de profissão que Força Aérea Brasileira me deu, Carolina Druck e Michele Dias. O que passamos juntas nesses 3 anos só nós sabemos (poderia dar umas 14 temporadas do Netflix, não é mesmo??!). Obrigada, do fundo do coração, por me aguentarem com todo tipo de humor, me incentivando, me protegendo e me lembrando todos os dias que somos mulheres fortes e capazes. Ninguém segura esse trio!

Aos secretários do PPGO, agradeço a simpatia, prontidão, organização e dedicação. Vocês são essenciais.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade de realização deste Doutorado.

Obrigada a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional, pessoal e tornaram a minha vida mais feliz.

RESUMO

Infecção e disbiose estão correlacionadas com a síndrome metabólica. Porém, ainda é necessário que haja investigações sobre a influência da periodontite apical neste contexto. Esta tese contempla uma revisão de literatura acerca do tema e um trabalho experimental que avaliou a influência da periodontite apical em um modelo de desordem metabólica induzido por suplementação com frutose 10% (HFD) durante 8 semanas. Foram utilizados 60 ratos wistar machos, os quais foram subdivididos em: G1- controle (ingestão de água filtrada e sem indução lesão periapical); G2- controle HFD (ingestão de frutose e sem indução lesão periapical); G3- controle 14 dias PA (ingestão de água filtrada e com indução lesão periapical por 14 dias); G4- HFD 14 dias PA (ingestão de frutose e com indução lesão periapical por 14 dias); G5- controle 28 dias PA (ingestão de água filtrada e com indução lesão periapical por 28 dias); G6- HFD 28 dias PA (ingestão de frutose e com indução lesão periapical por 28 dias). Durante as 8 semanas de experimento, os animais foram pesados a cada 2 dias. Os consumos de ração e água foram medidos diariamente. Após as 8 semanas, foi realizada a medição da glicemia e coleta de fezes de cada animal para avaliação da bactéria *Akkermansia muciniphila* através de PCR. Em seguida, os animais foram eutanasiados. Foram removidas as mandíbulas, para análise histológica; o soro do sangue e o intestino para análise de citocinas (TNF, IL-1 β e IL-6) e adipocinas (leptina e adiponectina) através de ELISA; o fígado e o coração para análise de estresse oxidativo (catalase e glutatona) através de espectrofotometria. Os resultados demonstraram que houve aumento de peso, de ingestão de água (polidipsia) e de glicemia nos grupos submetidos ao HFD, independente de

indução de PA, confirmando que o modelo experimental foi capaz de induzir diabetes tipo2 relacionada à obesidade. Não houve variação nos níveis de TNF, IL-1 β e IL-6 entre os grupos experimentais. Os níveis de leptina e de adiponectina estavam significativamente aumentados no G2. Os níveis intestinais de leptina estavam aumentados nos grupos 5 e 6. Um aumento nos níveis de glutathiona foi observado nos animais do G4. Ocorreu indução de periodontite apical nos grupos 3, 4, 5 e 6, sem alterações provocadas pela HFD. Tanto a PA quanto o HFD foram capazes de provocar disbiose, diminuindo significativamente os níveis de expressão de *A. muciniphila*. Concluindo, o presente estudo demonstra, pela primeira vez, que a PA exerce influência sistêmica e impacta desordens metabólicas modulando o metabolismo intestinal e a microbiota.

Palavras-chave: Periodontite Apical, Obesidade, Diabetes tipo 2, *Akkermansia muciniphila*, Inflamação.

ABSTRACT

Infection and dysbiosis present a close relationship with metabolic diseases, although the influence of apical periodontitis (AP) in this context needs further investigation. This thesis includes a review and an experimental study that evaluated the influence of AP in a rat model of metabolic disorder induced by 10% fructose supplementation. 60 male Wistar rats were used. Animals that received high fructose diet (HFD; N=30) or filtered water (control; N=30) were subdivided into additional groups: (i) without induction of AP (N=20); (ii) with AP induction 2 weeks before euthanasia (14 days; N=20); (iii) with AP induction 4 weeks before euthanasia (28 days; N=20). HFD triggered obesity-related type2 diabetes, as indicated by induction of overweight and hyperglycemia, besides polydipsia, regardless of the AP induction. There was no variation in the serum or intestinal levels of TNF, IL-1 β and IL-6 among the experimental groups. Serum leptin and adiponectin levels were significantly elevated in the HFD group, without AP induction. The intestinal levels of leptin were significantly increased in the groups with 28 days of AP induction, despite HFD. A significant elevation of liver glutathione levels was observed in animals submitted to HFD and AP for 14 days. AP induction (14 or 28 days) led to pulp and periapical tissue inflammation, without any influence of HFD. Either HFD or AP induction led to dysbiosis, as indicated by a significant reduction of fecal *A. muciniphila* expression. Concluding, we provide novel evidence that AP can have systemic impacts on metabolic disorders, likely by modulating intestinal metabolism and microbiota.

Key words: Apical periodontitis, Obesity, Type 2 Diabetes, *Akkermansia muciniphila*, Fructose, Gut Microbiota.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 <i>Epidemiologia das Desordens Metabólicas: Obesidade e Diabetes Mellitus Tipo2</i>	13
1.2 <i>Relação da Obesidade e do Diabetes Tipo 2 com a Inflamação e o Estresse Oxidativo</i>	16
1.3 <i>Relação da Obesidade e do Diabetes Tipo 2 e Microbiota do Trato Gastrintestinal</i>	21
1.4 <i>Distúrbios Metabólicos no Contexto Odontológico</i>	23
2. OBJETIVOS	29
<i>Objetivo Geral</i>	29
<i>Objetivos Específicos</i>	29
3. CAPITULO I.....	30
<i>Manuscrito 1</i>	30
Apical periodontitis: maybe another foe in the obesity cyclic drama	31
3.1 <i>Abstract</i>	32
3.2 <i>Introduction:</i>	33
3.3 <i>Review:</i>	35
3.4 <i>Conclusion:</i>	43
<i>Figure 1 – Manuscript I</i>	44
3.5 <i>Legend to the Figure 1 – Manuscript I</i>	45
3.6 <i>References:</i>	46
4. CAPITULO II.....	54
<i>Manuscrito 2</i>	54
Crosstalk between apical periodontitis and metabolic disorders: experimental evidence on the role of intestinal adipokines and <i>Akkermansia muciniphila</i>	55
4.1 <i>Abstract</i>	57
4.2 <i>Introduction</i>	59
4.3 <i>Material and methods</i>	61
4.4 <i>Results</i>	66
4.5 <i>Discussion</i>	68
4.6 <i>Conclusion</i>	73
<i>Figure 1</i>	74
<i>Figure 2</i>	75

Figure 3.....	76
Supplementary Figure 1.	79
Supplementary Figure 2.	80
4.8. References	81
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	90
ANEXO 1 – Carta de Aprovação Comissão Científica da Faculdade de Odontologia e código SIPESQ	99
ANEXO 2 – Carta de Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	100
ANEXO 3 – Termo de Responsabilidade CEUA.....	101

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia das Desordens Metabólicas: Obesidade e Diabetes Mellitus Tipo2

A obesidade é uma doença crônica multifatorial caracterizada pela presença excessiva de gordura. Esta condição leva a uma série de efeitos adversos no metabolismo do indivíduo, como alteração da pressão arterial, do colesterol (LDL), dos triglicerídeos e, resistência à insulina¹. Sendo assim, ocorre o aumento do risco de várias complicações que podem levar à incapacidade ou à morte do indivíduo. O diabetes, a hipertensão, a isquemia, alguns tipos de câncer e a doença periodontal são exemplos de doenças que vêm sendo associadas com a obesidade².

Os obesos têm pouca ou nenhuma sintomatologia³; este estado subclínico contribui para a elevada taxa de pacientes que apresentam tal condição crônica. Atestando a seriedade da doença, a Organização Mundial de Saúde (OMS) associa a obesidade com o aumento da morbidade e mortalidade mundial. Os outros fatores incluídos nesta categoria são: falta de saneamento da água, baixo peso ao nascer, desnutrição, diabetes, hipertensão, consumo de álcool e tabaco e pratica sexual não-segura⁴.

Ainda nos dias de hoje, a OMS recomenda o índice de massa corporal (IMC) para o cálculo de agravamento da mortalidade. Este índice leva em consideração o peso e altura corporal. A média de IMC para a população adulta deveria variar entre 21 e 23 kg/m², enquanto que individualmente deveria se manter entre 18,5 e 24,9 kg/m². O risco de comorbidades é agravado quando o IMC varia entre 25 e 29,9 kg/m² (considerado sobrepeso) e passa a ser severo quando o IMC for maior que 30 kg/m² (obesidade). A partir de 40 kg/m² considera-se obesidade mórbida⁵.

Segundo o último levantamento realizado pela OMS (ano de 2014), pessoas no mundo todo estão morrendo em consequência do sobrepeso ou obesidade. Pelo menos

2,8 milhões de pessoas morrem a cada ano por esse motivo. Espantosamente, a região das Américas possui a maior prevalência de sobrepeso e obesidade comparativamente a outras partes do mundo. Os índices da OMS para ambos os sexos são de 62% de sobrepeso e 26% de obesidade, sendo o sexo feminino o mais prevalente (50% com sobrepeso e 29% de obesas). A região do sul da Ásia apresenta os índices mais baixos da categoria, com 14% de sobrepeso em ambos os sexos e, apenas 3% de pessoas obesas⁵.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 82 milhões de pessoas estão acima do peso no Brasil (cerca de 60% da população total do país). Estes dados foram coletados após a realização da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), que mede e pesa uma amostra da população, levanta suas receitas e despesas do orçamento doméstico e, investiga informações sobre o tipo de comida que cada família consome e, em quais quantidades. O estudo revela também a falta de alimentação balanceada por parte da população brasileira⁶.

A obesidade é considerada uma doença de proporções epidêmicas⁷. Em 2016, mais de 41 milhões de crianças abaixo dos cinco anos de idade apresentam sobrepeso, demonstrando, claramente, a urgência do desenvolvimento de iniciativas e programas com investimentos em níveis populacionais. A finalidade das estratégias é a não inclusão destas crianças em estatísticas futuras de grupos de vulnerabilidade e incapacidade por consequência das comorbidades ou, também chamadas, “doenças não comunicáveis”⁸.

O Diabetes Mellitus é outro grande problema mundial de saúde. A *International Diabetes Federation* (IDF) indicava no ano 2000 uma estimativa de que haveria 350 milhões de pessoas no mundo com diabetes tipo 2 no ano de 2030. Surpreendentemente, no ano de 2011⁹, esta estimativa já havia sido superada apresentando 366 milhões de portadores e, em 2014¹⁰, esse número era de 422 milhões de indivíduos com a doença. Ainda mais alarmante é o fato de que metade das pessoas portadoras da doença já apresentam sinais de complicações da desordem¹¹. O diabetes mellitus tipo 2 (T2DM) é responsável por 90% dos casos de diabetes (os outros 10% correspondem ao diabetes

mellitus tipo I). É caracterizado como uma desordem crônica metabólica e ocorre quando há alterações no metabolismo dos carboidratos, gordura e proteínas. Os resultados são defeitos na secreção e/ou ação da insulina, levando a um aumento na concentração de glicose sanguínea (hiperglicemia)¹¹.

Esta condição, proveniente do excesso de peso e da falta de atividade física, aumenta o risco de danos microvasculares (retinopatia, nefropatia, neuropatia) e macrovasculares (isquemia cardiovascular, derrame e doença vascular periférica). Está associada também à redução da qualidade e da expectativa de vida do indivíduo portador¹².

A associação de hiperinsulinemia, hipertensão, hipertrigliceridemia e obesidade visceral compõe o “*quarteto da morte*” e a sua sinergia caracteriza a Síndrome Metabólica (MetS)¹³. Os seguintes fatores estão presentes nos indivíduos incluídos neste grupo: 1- obesidade abdominal (gordura excessiva ao redor do abdômen); 2- dislipidemia aterogênica (desordens sanguíneas, triglicédeos altos, baixo colesterol HDL, alto colesterol LDL, formação de placas nas paredes arteriais); 3- pressão arterial elevada; 4- intolerância à glicose ou resistência à insulina; 5- estado pró-trombótico (fibrinogênio elevado sistemicamente); e 6- estado pró-inflamatório (proteína C reativa, CRP elevada sistemicamente). Esta classificação é a mais aceita e foi recomendada pela *American Heart Association*¹⁴. Por outro lado, sabe-se que o indivíduo pode apresentar características fenotípicas de obeso, com aumento do tecido adiposo, sem necessariamente manifestar anormalidades metabólicas¹⁵. Estes indivíduos são incluídos no grupo de “obesos metabolicamente saudáveis”¹⁶.

Em um estudo avaliando pessoas obesas e não obesas, com ou sem distúrbio metabólico, os resultados indicaram que, tanto no grupo de obesos, como no grupo de não obesos, as mulheres apresentaram uma tendência a ser metabolicamente saudáveis 2 a 4 vezes maior do que os homens. No grupo de pessoas obesas, a prevalência foi de 6,8% a 36,6% para indivíduos metabolicamente saudáveis. Observou-se ainda, que aquelas

pessoas que seguiam as recomendações da pirâmide alimentar e mantinham uma dieta de alta qualidade foram associados positivamente com obesos metabolicamente saudáveis¹⁷. A falta de atividade física, estresse, tabagismo e o consumo de álcool (representando o estilo de vida) também estão associados com o aumento do risco relacionado à obesidade, doenças cardiovasculares e T2DM.

O estilo de vida contemporâneo contribui para o sedentarismo e uma alimentação com maior ingestão calórica, afetando não só países desenvolvidos, mas países em desenvolvimento também. Esta mudança global de hábitos resulta nos dados espantosos de acometimento de doenças como a obesidade e o diabetes¹. Portanto, é extremamente necessário que haja esforços preventivos e tratamentos multidisciplinares efetivos, evitando assim o seu crescimento e suas complicações. Fatores genéticos, endócrinos, ambientais, socioeconômicos e comportamentais têm sido considerados importantes no desenvolvimento da obesidade⁹. Porém, os mecanismos moleculares que dizem respeito à perda de funcionalidade ótima do tecido adiposo, bem como, à instalação de resistência à insulina nos indivíduos obesos, ainda permanecem por serem esclarecidos^{17,18}.

1.2 Relação da Obesidade e do Diabetes Tipo 2 com a Inflamação e o Estresse Oxidativo

A relação entre obesidade, resistência à insulina, diabetes e as suas conseqüentes complicações vem sendo pesquisada dentro do campo da biologia celular e molecular, com base na histofisiologia e na patogênese de tais desordens. A complexidade dos quadros e a origem multifatorial requerem estudos adicionais, correlacionados com inflamação crônica e estresse oxidativo¹⁹.

Em níveis moleculares, a obesidade é caracterizada pela presença aumentada de proteínas de fase aguda e citocinas pró-inflamatórias³. Os níveis elevados de marcadores inflamatórios da obesidade são resultantes da atividade endócrina em resposta ao excesso de tecido adiposo²⁰. Ademais, os fatores ambientais já citados, como alimentação,

atividade física, estresse, tabagismo e alcoolismo, são capazes de ativar ou silenciar genes envolvidos no processo de patogênese da obesidade. Essas interações com o genoma são chamadas de fatores epigenéticos e ocupam importante papel nas doenças crônicas, uma vez que modulam a expressão de vários genes associados à obesidade²¹. Interessantemente, células do tecido adiposo possuem capacidade de estimulação da produção de células imunes, contribuindo para a instalação dessas doenças através da inflamação²².

Os adipócitos constituem parte do tecido adiposo. Este tecido é um tipo especial de tecido conjuntivo, que apresenta o maior depósito de energia corporal sob a forma de triglicerídeos. Esses depósitos se renovam continuamente; porém, não são estáveis, sendo influenciados por estímulos nervosos e hormonais. Os triglicerídeos mantidos no tecido adiposo podem ser armazenados a partir da alimentação, podem ser oriundos do fígado e transportados até o tecido adiposo ou, podem ser derivados da síntese dos próprios adipócitos a partir da glicose²³.

Diversas citocinas, tais como interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-10 (IL-10), são secretadas pelos adipócitos²⁴. Estas células gordurosas são reguladas diretamente pelo TNF no local do acúmulo de gordura, que conseqüentemente age interferindo na homeostase da glicemia e promovendo maior resistência à insulina²⁵. Sendo assim, a obesidade é considerada fator chave para o desenvolvimento de T2DM²⁶.

A obesidade apresenta principalmente células do infiltrado inflamatório crônico e as citocinas IL-6 e TNF²⁰. Os macrófagos e os mastócitos são as principais fontes destas citocinas. O papel do TNF é mediar respostas inflamatórias agudas a bactérias e outros microorganismos infecciosos. Já, a IL-6, também atua nas respostas agudas apresentando efeitos locais e sistêmicos, induzindo ainda a síntese hepática de diversos outros mediadores, além da estimulação e produção de neutrófilos e a diferenciação de linfócitos T *helper*²⁷. Existe uma correlação positiva entre o volume de gordura e o TNF circulante²⁸, indicando uma reação de corpo estranho às células gordurosas¹⁸. Quanto à IL-6, sua fonte

parece estar fortemente relacionada à gordura visceral, com adipócitos sendo responsáveis por 30% de sua secreção²⁵.

Níveis elevados de inflamação estão associados também com um aumento na CRP, uma proteína plasmática envolvida na imunidade inata e no reconhecimento de estruturas microbianas. Essas proteínas são sintetizadas pelo fígado, induzidas pelas citocinas interleucina-1 β (IL-1 β ; também mediadora de respostas inflamatórias agudas com ações similares ao TNF) e IL-6 (também indutora do fibrinogênio)²⁷. Pacientes com obesidade ou resistência à insulina apresentam IL-6 e CRP aumentados e, inversamente, há diminuição sérica destes marcadores e aumento da tolerância à insulina quando o paciente é submetido à cirurgia bariátrica e apresenta perda de peso²⁹.

Além de produzirem citocinas, os adipócitos são potentes produtores de adipocinas: adiponectina, adiposina, resistina e leptina. A adiponectina apresenta efeitos biológicos importantes, possuindo efeitos anti-inflamatórios, podendo ainda influenciar em doenças cardiovasculares, diabetes e alguns tipos de câncer³⁰. A presença da adiponectina em ratos sépticos produz a redução da inflamação através da diminuição dos níveis de IL-6 e TNF³¹. Na presença de obesidade, diabetes, resistência à insulina ou doença cardiovascular, esta citocina está diminuída³².

A resistina apresenta efeito pró-inflamatório marcante e parece estar associada com a resistência à insulina³³. Já, a leptina, é uma adipocina que participa na regulação da quantidade de tecido adiposo no corpo e ingestão de alimentos²³. A resistência à leptina ou a leptinemia acarreta acúmulo de peso e obesidade³⁴. Este hormônio proteico também tem sido sugerido como mediador inflamatório, inclusive no tecido pulpar dentário e, pode levar à diferenciação de células dendríticas e a sua capacidade de estimular a reatividade das células do sistema imune (Th1)³⁵.

Recentemente, foi realizado um estudo utilizando um modelo de fibroblastos derivados de adipócitos e células do baço para avaliar o impacto dos adipócitos em células imunes convencionais. O estudo demonstrou a capacidade de produção da quimiocina

CCL5 (das células Th1), bem como, indicou a produção de citocinas selecionadas pelo baço resultante da estimulação por adipócitos. Os autores sugerem ainda que a capacidade imune pode não estar limitada à produção direta de mediadores inflamatórios, mas inclui a modulação das células imunológicas³⁶.

O receptor *toll-like 4* (TLR4) é encontrado especialmente em células do sistema imune, incluindo monócitos e macrófagos³⁷. Porém, células insulino-sensitivas, como adipócitos e células musculares, também expressam este receptor^{38,39}. A estimulação do TLR4 ativa as células do sistema imune, que subsequentemente ativam fatores de transcrição (como o fator nuclear kappa B; NFκB), os quais produzem as citocinas inflamatórias TNF, IL-1β, IL-6, já mencionadas anteriormente⁴⁰. A consequência é a resistência à insulina nos tecidos via inibição da fosforilação da tirosina-quinase presente no receptor e no substrato⁴¹. Até o presente momento, 13 receptores do tipo *toll-like* foram identificados em seres humanos. O receptor *toll-like 4* (TLR4) é ativado, principalmente, por lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas^{42,43}. Além disso, o TLR4 reconhece alguns lipídeos (como ácidos graxos saturados) e citocinas do hospedeiro, participando de maneira importante na patogênese de doenças inflamatórias não infecciosas, tais como a obesidade e o diabetes⁴³. Os níveis de receptores TLR4, LPS e ácidos graxos apresentam-se elevados nestes pacientes³⁸. Em um estudo recente, pesquisadores utilizaram camundongos db/db com T2DM e obesidade. Os resultados demonstraram que a expressão do RNAm do TLR4 e a secreção de citocinas, como IL-1β, IL-6 e TNF, aumentaram com o desenvolvimento da hiperglicemia⁴⁰. Concomitantemente à inflamação, manifesta-se o estresse oxidativo em pacientes obesos e resistentes à insulina¹⁹.

O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e as defesas antioxidantes gera metabólitos de oxigênio molecular (O₂). Estas reações formam produtos do metabolismo aeróbio e consistem de: radical superóxido (O₂⁻), radical óxido nítrico (NO), radical hidroxila (OH⁻) e não-radicais, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxinitrito (ONOO⁻)⁴⁴. Estes radicais livres são derivados da membrana celular das

mitocôndrias, núcleo, lisossomos, peroxissomos, retículo endoplasmático e citoplasma⁴⁵. Embora o estresse oxidativo seja desejável em níveis normais para o funcionamento equilibrado do corpo humano, a exposição crônica e excessiva ao ROS danifica o tecido através da modificação de proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA celular. A presença de enzimas, como a mieloperoxidase (MPO – que transforma os superóxidos em ROS) e a óxido nítrico sintase induzida (iNOS – que produz espécies reativas de nitrogênio gerando óxido nítrico em grande quantidade) provoca produtos tóxicos para microorganismos (quando estes se fazem presentes) e também para os tecidos. Estes mecanismos são induzidos e ativados por muitas vias, incluindo sinais dos TLRs, já comentados anteriormente²⁷.

O estresse oxidativo pode ser monitorado por diversos biomarcadores (anti- e pró-oxidantes). As proteínas carboniladas do plasma são biomarcadores sistêmicos de estresse oxidativo. Estas proteínas estão aumentadas em obesos⁴⁵, e ainda apresentam correlação positiva com a resistência à insulina reduzindo-se significativamente após diferentes tratamentos para obesidade⁴⁶. O plasma sanguíneo, meio de transporte das proteínas de baixa densidade (LDL), retém uma vasta gama de defesas antioxidantes a fim de manter o equilíbrio redox do organismo. Dentre estas se encontram as defesas enzimáticas (superóxido dimutase [MnSOD], catalase, tioredoxina e glutathione peroxidase) e as defesas não-enzimáticas (glutathione, ascorbato)⁴⁴.

Os indivíduos obesos possuem estresse oxidativo elevado sistemicamente¹⁹. Existe uma associação entre o índice de massa corporal (IMC) e os altos níveis de estresse oxidativo, sendo que o aumento do IMC provoca diminuição nas defesas anti-oxidantes, e concentração de glutathione nos eritrócitos²⁶. Por outro lado, a redução da gordura corporal causa diminuição na formação de oxidantes⁴⁶. Até o momento, esta minimização de oxidação está ligada ao uso de antioxidantes polifenólicos⁴⁷, dieta hipocalórica e a realização regular de exercícios físicos^{48,49}.

O diabetes mellitus está associado com o aumento do estresse oxidativo através da produção e acúmulo de produtos de oxidação do DNA, lipídeos e proteínas; biomoléculas glicadas; produtos avançados finais da glicação (AGE) e produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP)⁵⁰. AGEs e AOPPs são produtos finais específicos derivados de reações não-enzimáticas e considerados biomarcadores úteis para o diabetes⁵¹. A glicação e o estresse oxidativo da hiperglicemia e dislipidemia levam à aceleração de modificações de biomoléculas essenciais, principalmente proteínas⁵². Recentemente, pesquisadores testaram biomarcadores de estresse oxidativo (AGEs, AOPPs, NOx e oxLDL) em pacientes com níveis de glicose normal, pré-diabéticos e diabéticos. Todos os marcadores se encontravam significativamente aumentados em pacientes pré-diabéticos e diabéticos comparativamente àqueles com glicose normal⁵¹.

Diante das informações apresentadas, torna-se relevante investigar o papel da inflamação e do estresse oxidativo, a partir de infecções odontológicas, no organismo de indivíduos com T2DM e obesidade. Ademais, a investigação de biomarcadores nesse contexto é fundamental, pois os mesmos refletem a presença e a severidade de hiperglicemia, estresse oxidativo e resposta inflamatória⁵³.

1.3 Relação da Obesidade e do Diabetes Tipo 2 e Microbiota do Trato Gastrointestinal

O processo inflamatório subclínico não está relacionado somente com o excesso calórico, mas também com outros iniciadores e promotores deste estado, os quais mantêm a sua natureza cíclica. Uma das fontes é a microbiota do trato gastrointestinal (TGI)⁵⁴. A microbiota humana é composta por aproximadamente 100 trilhões de bactérias, que somadas atingem o peso de 2 a 3 kg⁵⁵. Estas bactérias possuem um papel importante na manutenção da saúde do hospedeiro. Porém, é necessário que a comunidade microbiana se mantenha em equilíbrio para que não ocorra o desencadeamento ou perpetuação de estados inflamatórios que provoquem a dessensibilização dos receptores

de insulina, alterações cardiovasculares ou, até mesmo, câncer^{54,56}. Contemporaneamente, a microbiota do TGI tem sido fortemente apontada como um dos causadores de desordens metabólicas⁵⁷.

O hospedeiro possui um número limitado de hidrolases necessárias para a digestão de polissacarídeos complexos. Microorganismos como: *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Alistipes* e *Akkermansia* são associadas com indivíduos saudáveis, não obesos, quando estão em número prevalente (alta contagem gênica)⁵⁸. Uma das atividades desta microbiota intestinal é digerir fibras insolúveis como a celulose ou lignina e, também, as solúveis, como os galactoligossacarídeos e frutoligossacarídeos⁵⁹. Essas fibras são solubilizadas em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como o acetato, butirato e propionato que constituem de 5 a 10% da fonte de energia em pessoas saudáveis^{60,61}. Além disso, os AGCCs agem na sinalização de moléculas do tecido adiposo, mantendo o balanço energético e regula a glicogênese intestinal⁶²

A camada de muco do trato gastrointestinal é secretada pelas células caliciformes intestinais. Nesta camada, residem bactérias como as gram-positivas *Bifidobacterium bifidum* e as gram-negativas *Akkermansia muciniphila*⁶³, que constituem de 3 a 5% de toda a microbiota intestinal e está inversamente correlacionada com a presença de obesidade, diabetes, doenças cardiometabólicas e inflamação crônica^{64,65,66,67}. Animais tratados com *A. muciniphila* diminuíram o peso e a hiperglicemia foi revertida. Além disso, *A. muciniphila* controla o armazenamento de gorduras, a inflamação do tecido adiposo e o metabolismo glicêmico, demonstrando funções metabólicas benéficas⁶⁸.

Corroborando com esta ideia, um estudo muito interessante demonstrou o forte envolvimento entre as bactérias do TGI e a obesidade⁶⁹. Os autores introduziram a microbiota de gêmeas humanas discordantes quanto à obesidade em camundongos *germ-free* através do transplante de fezes. Surpreendentemente, foi observado que a obesidade humana era transferida para os camundongos, deixando claro o papel dos microrganismos no desenvolvimento da desordem metabólica.

O desequilíbrio na microbiota do trato gastrointestinal chama-se disbiose. Este desequilíbrio tem como resultado a endotoxemia metabólica provocada principalmente por lipopolissacarídeos (LPS) provenientes de bactérias gram-negativas⁷⁰. A ingestão de alimentos com alto teor de ácidos graxos provoca um aumento de bactérias produtoras de lipopolissacarídeos, bem como, um aumento na permeabilidade de barreiras protetoras formadas por bactérias como a *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp^{71,72,73}. Dessa forma, há permeabilização de lipopolissacarídeos no tecido adiposo e na corrente sanguínea, provocando a liberação de adipocinas e citocinas. O intestino é um órgão com rápida resposta inflamatória, abrigando mais linfócitos do que todos os órgãos linfoides juntos. O resultado é a indução de inflamação cíclica que, por sua vez, induz resistência à insulina e favorece a obesidade⁷⁴.

A microbiota intestinal ocupa um espaço considerável no meio científico, sendo considerada um “novo órgão”, capaz de afetar vários sistemas biológicos, tais como o sistema imune e funções metabólicas, o desequilíbrio desta comunidade deve ser estudado a fim de correlacionar os distúrbios e os seus agravos.

1.4 Distúrbios Metabólicos no Contexto Odontológico

É indiscutível que os profissionais de Odontologia devem estar atentos aos pacientes que possuem quaisquer desordens sistêmicas. Uma vez que há um aumento crescente do número de indivíduos que possuem alterações metabólicas, tais como a obesidade e o diabetes, o plano de tratamento deve ser direcionado à minimização dos danos. No entanto, a Odontologia contemporânea deve ser voltada não somente às repercussões locais advindas das alterações sistêmicas, mas deve se preocupar com os desfechos do tratamento, a fim de, a partir do controle local da infecção, melhorar os níveis de saúde geral. SAUDE GERAL E BUCAL – OU TEM SAÚDE OU NÃO TEM

A periodontite apical crônica, também chamada de lesão periapical, é uma patologia que pode se configurar como granuloma ou cisto e pode apresentar,

concomitantemente, reabsorção óssea dos tecidos circundantes. Já, em 1965, em um estudo clássico realizado por Kakehashi, Stanley e Fitzgerald⁷⁵, os autores deixam claro que a etiologia da periodontite apical é decorrente da invasão microbiana para o interior do sistema de canais radiculares. Neste estudo, polpas vitais foram expostas ao meio bucal e observadas histologicamente. Foi proposta a relação entre a presença dos microorganismos no canal radicular com o aparecimento de lesões periapicais crônicas. Os autores avaliaram ratos *germ-free* e ratos com microbiota convencional após exposições pulpares não tratadas. Observou-se que os ratos *germ-free*, mesmo sem nenhum tratamento, apresentaram formação de ponte de dentina a partir do 14º dia de exposição e nenhuma necrose pulpar, abscesso ou granuloma periapical. No entanto, no grupo dos ratos com microbiota convencional, foi constatada a presença de necrose pulpar e formação de lesões periapicais crônicas em virtude da presença das bactérias.

O papel dos produtos microbianos intra- e extracelulares liberados (como enzimas, toxinas e restos celulares) também são importantes na formação das lesões, pois provocam respostas inflamatórias por parte do hospedeiro⁷⁶. A presença das bactérias gram-negativas também merece destaque. Estes microorganismos possuem LPS, uma toxina presente na parede celular que é liberada durante a desintegração, multiplicação ou morte da bactéria. Esta endotoxina é capaz de penetrar nos tecidos perirradiculares e produzir citocinas. Estas citocinas são produzidas pela ativação dos receptores *toll-like* (TLRs), especialmente TLR4, causando danos aos tecidos pelo desenvolvimento de eventos inflamatórios e de estresse oxidativo. A maior parte da resposta imune contra o LPS provém do componente bioativo chamado “Lipídeo A”. Outros fatores contribuintes são o sinergismo das bactérias e a agregação dos microorganismos em forma de biofilme microbiano. Na tentativa de combate à infecção, as células de defesa ficam ativando constantemente vias de sinalização inflamatórias⁷⁷.

Como não existe barreira epitelial entre o sistema de canais necróticos infectados e o tecido granulomatoso altamente vascularizado que se forma neste tipo de infecção,⁷⁸ o indivíduo está suscetível às repercussões adversas sistêmicas⁷⁹. Ao longo dos anos,

pesquisadores têm demonstrado associação entre as alterações odontológicas locais e respostas sistêmicas. A área da periodontia possui uma vasta gama de artigos correlacionando esses temas^{13,80,81,82,83,84,85,86}.

A inflamação que ocorre nos tecidos periapicais é muito parecida com a inflamação crônica dos tecidos periodontais. A periodontite (doença periodontal crônica) é uma patologia odontológica de fundo infeccioso que leva ao desenvolvimento da inflamação gengival, seguida de perda óssea alveolar, e, em casos mais severos, culmina na perda do dente por falta de inserção⁸⁷.

Em 1993, a periodontite crônica foi reconhecida como a sexta complicação mais relacionada ao diabetes mellitus⁸⁸, visto que os indivíduos portadores desta condição apresentavam prevalência mais alta de periodontite, bem como, um progresso mais severo e mais rápido, do que indivíduos saudáveis⁸⁹. Além disso, pacientes portadores do diabetes, mas bem controlados, apresentam menos gengivite e periodontite do que os indivíduos não-controlados⁹⁰. A inflamação provocada pela doença periodontal afeta o controle glicêmico e é considerada um fator importante na patogênese do diabetes. Este mecanismo ocorre similarmente em pacientes obesos, os quais apresentam exacerbação da resistência à insulina, quando a periodontite está presente, resultando em difícil controle glicêmico⁸³. Os efeitos adversos provocados no tecido periodontal incluem a diminuição da renovação de colágeno, função neutrofílica debilitada e menor poder de destruição bacteriana, culminando no aumento da perda dos tecidos periodontais^{91,92}.

A quimiotaxia dos neutrófilos é reduzida e o controle da apoptose é alterado, com acúmulo destas células no sítio periodontal⁹³. Os AGE também se acumulam no periodonto e, provocam mudanças nas células e nos componentes da matriz extracelular. As metaloproteinases (MMPs) da matriz (por exemplo, a colagenase), as quais são abundantes nos pacientes diabéticos, deixam o colágeno suscetível à degradação⁹⁴. Da mesma forma, o metabolismo ósseo é afetado pelas MMPs que diminuem a renovação deste tecido⁸³. A presença do diabetes causa ainda um prolongamento na resposta a *P.*

Gingivitis (bactéria comumente encontrada em periodontite), causando um aumento na produção do TNF. A destruição óssea é provocada pelo TNF, que induz a osteoclastogênese pela ativação do receptor ativador do fator nuclear kappa-B ligante (RANKL)^{83,95}.

Sistemicamente, há alteração da homeostase circulatória e imune pela presença exagerada de citocinas inflamatórias em pacientes diabéticos e obesos. Por isso, os componentes da resposta de fase aguda, como o fibrinogênio e a CRP têm sido encontrados em níveis altos⁹⁶. Na presença de patógenos, os macrófagos e monócitos elevam os níveis de citocinas como a IL-1, IL-6 e o TNF, piorando a inflamação crônica sistêmica⁹⁷. Interações entre AGE e o seu receptor resultam na produção aumentada de citocinas por células inflamatórias. O receptor para AGE (RAGE) pode ser encontrado nas células musculares lisas, células endoteliais, neurônios, macrófagos e monócitos. As AGE modificam a parede e o lúmen dos vasos sanguíneos, podendo ser correlacionados com a presença do LDL, o qual participa da formação de ateromas em vasos principais. Já nos vasos menores, o espessamento causa comprometimento no transporte de nutrientes pela membrana⁹⁸.

O tratamento periodontal reduz os níveis de hemoglobina glicada e melhora o perfil lipídico. Ademais, os estudos têm demonstrado que a terapia periodontal, mecânica e química pode ajudar no controle glicêmico e lipídico^{13,83,99}. Outro benefício é a redução do risco de formação de aterosclerose e doença cardiovascular¹⁰⁰.

Com relação à periodontite apical, um estudo realizado em ratos Wistar demonstrou a associação desta patologia endodôntica com a alteração da sinalização e sensibilidade à insulina. Os autores utilizaram a citocina TNF como biomarcador, observando a sua elevação plasmática após a indução de lesões periapicais¹⁰¹. Outro estudo experimental demonstrou o efeito do antioxidante tempol sobre lesões periapicais. Os resultados obtidos apontaram para a diminuição no tamanho das lesões periapicais em ratos cardiopatas após a submissão ao tratamento com o agente

antioxidante. Houve também a melhora dos sinais relacionados à cardiomiopatia, incluindo perda de peso e melhora na locomoção¹⁰².

A associação das bactérias existentes no tecido periapical com a indução de citocinas inflamatórias já está bem descrita na literatura¹⁰³. Corroborando com este fato, pesquisadores investigaram, recentemente, em uma revisão sistemática e meta-análise, a relação entre a periodontite apical e modificação dos níveis sistêmicos de marcadores inflamatórios em humanos. Os resultados apontaram para um número limitado de evidências (20 estudos). Porém, sugerindo a associação de periapicopatia com níveis aumentados de CRP, IL-1, IL-2, IL-6, dimetilarginina assimétrica, IgA, IgG e IgM. Sendo assim, estes marcadores não estariam confinados ao local da lesão, mas interferindo sistemicamente⁷⁹. Além disso, outro estudo observou que após a infusão subcutânea de LPS em camundongos, houve resistência à insulina e obesidade similar àquela induzida após alimentação com alto teor de gordura¹⁰⁴. Sendo assim, torna-se interessante avaliar a relação entre o LPS liberado por bactérias presentes nas periapicopatias e as desordens metabólicas.

Quanto à prevalência de lesões periapicais, pesquisadores realizaram um estudo em indivíduos adultos da população brasileira. Os autores apontaram um aumento significativo da periodontite apical nos pacientes portadores de diabetes tipo 2. Ademais, foi sugerido que o diabetes pode servir como uma doença modificadora da periodontite periapical por tornar o indivíduo mais suscetível. No entanto, o estudo não foi capaz de confirmar a influência do diabetes na resposta ao tratamento endodôntico¹⁰⁵.

Apesar das evidências endodônticas acerca da influência do diabetes, ainda existem poucas informações quanto às alterações sistêmicas provocadas em conjunto com a obesidade. Um estudo que faça a determinação de biomarcadores séricos inflamatórios e de estresse oxidativo, avaliando a alteração de reguladores metabólicos e da microbiota gastrintestinal, correlacionando-os com uma afecção infecto-inflamatória da cavidade bucal (periodontite apical), pode ajudar a preencher a lacuna presente na literatura.

Ademais, uma vez que a incidência de síndrome metabólica está crescendo mundialmente, torna-se muito interessante o conhecimento destas atividades moleculares sistêmicas no momento da introdução de planos de tratamento mais completos que visem a não instalação das co-morbidades, diminuindo os custos de saúde pública.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de lesões periapicais em um modelo de síndrome metabólica em ratos e investigar a correlação destas alterações com os níveis de marcadores inflamatórios e com a microbiota intestinal, bem como avaliar qual o impacto periapical local a partir do efeito sistêmico.

REESCREVER BIRECIONAL

Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o desenvolvimento de lesões periapicais em ratos com síndrome metabólica induzida pela ingestão de frutose;
- ✓ Avaliar a influência do tempo de desenvolvimento das lesões periapicais correlacionando com os níveis de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo, na presença e ausência de síndrome metabólica;
- ✓ Avaliar as possíveis alterações de *Akkermansia muciniphila* oriunda do trato gastrointestinal em todos os grupos experimentais, correlacionando com o ganho de peso corporal, os biomarcadores, a presença ou ausência de lesão periapical, bem como, a presença ou ausência de síndrome metabólica.

3. CAPITULO I

Manuscrito 1

O artigo a seguir intitula-se “Apical periodontitis: maybe another foe in the obesity cyclic drama” e foi submetido à revista Iranian Endodontic Journal (fator de impacto 2,1; Qualis B1, Área de Odontologia, Quadriênio 2013-2016, CAPES).

Apical periodontitis: maybe another foe in the obesity cyclic drama

Cauana O. Tavares¹, Maria M. Campos²

¹PUCRS, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre/RS, Brasil; ²PUCRS; Instituto de Toxicologia e Farmacologia, Porto Alegre/RS, Brasil.

Corresponding author: Maria M. Campos, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Partenon, 90619-900, Porto Alegre, Brazil. Phone number: +55 51 3320 3562; Fax number: +55 51 3320 3626; Email: camposmmartha@yahoo.com; maria.campos@pucrs.br.

Acknowledgments

C.O.T. is PhD student supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES). M.M.C. is a researcher career awardee of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 303842-2014-8). We would like to thank Mr. Gregório Oliva Tavares for his valuable help with the designing of figure 1. The authors deny any conflicts of interest related to this study.

3.1 Abstract

Apical periodontitis: maybe another foe in the obesity cyclic drama

Millions of people die annually due to complications related to obesity. Sedentarism and a diet rich in fat and sugars is associated to body weight gain and the development of comorbidities as diabetes and hypertension. Studies have been demonstrating that feeding behavior is related to an imbalance in gut microbiota. The dysbiosis leads to endotoxemia (systemic low-grade inflammation) contributing to a cyclic inflammatory state and keeping metabolic syndrome (MetS). Oral cavity infections have been calling attention by their systemic impacts. Apical periodontitis (AP) is a chronic inflammatory response to dental root bacteria that destructs periapical normal tissues. As the area is highly-vascularized and there is no epithelial barrier, systemic repercussions are expected. There is a lack of scientific information about the crosstalk link among gut microbiota, inflammation, oxidative stress, AP and MetS.

Key-words: Apical periodontitis; Obesity; Metabolic Syndrome; Gut microbiota; Dysbiosis.

3.2 Introduction:

The world health public system has been witnessing the serious consequences of a silent ill with epidemic proportions, called obesity. At least 2.8-million people die annually due to complications related to this condition, and the rates are continuously increasing. According to the most recent World Health Organization bulletin, published in 2014, worldwide obesity has more than doubled since 1980. Currently, there are about 600-million obese and 2-billion overweight individuals worldwide. Regarding the geographical distribution, the WHO indicates a higher prevalence in Americas, when compared to the other parts of the world¹. The index for both sexes is astonishing, with 62% of overweight and about 26% of obesity, with females presenting a higher prevalence of obesity (50% overweight and 29% obese). Conversely, the South Asia has the lowest rates, with 14% overweight in both sexes, and only 3% of obese people. These numbers are even more alarming when considering the comorbidities, such as type 2 diabetes and hypertension. The illness greatly compromises the life quality of individuals, showing elevated morbidity and mortality, with prominent public health costs²

Several pieces of evidence^{3,4,5,6,7,8,9,10} indicate a close relationship among obesity, gut microbiome, inflammation and secondary metabolic dysfunctions, such as dyslipidemia and insulin resistance. Although body weight gain is strongly associated with lifestyle (sedentarism plus a western diet rich in fat and sugars), obesity has been considered a disease, rather than a choice². Feeding behavior is directly related to an imbalance in gut microbiota. Trillions of microorganisms inhabit the intestine and many studies have clearly demonstrated a positive correlation between dysbiosis and obesity-

related complications. Endotoxemia likely induces a low-grade systemic inflammatory state, fully contributing to metabolic syndrome (MetS). Oral cavity infections, especially periodontal diseases, have been calling attention along the last years by their systemic impacts^{11,12,13,14,15,16}.

Apical periodontitis (AP) is a chronic disease of infectious origin that surrounds the dental root apex. In this type of infection, the root canal is a persistent source of bacterial pathogens and endodontic intervention is necessary for tissue healing¹⁷. If not treated, the normal periapical tissue is destructed by a chronic inflammatory response, leading space to bone resorption and a high-vascularized granulomatous tissue formation. In the absence of the epithelial barrier, systemic repercussions are expected¹⁸.

It is now widely accepted that low-grade systemic inflammation causally links to the development of metabolic disorders and their complications. Apical periodontitis and its correlation with MetS have not been well explored up to now. There is a lack of scientific studies about this topic and the medical and dental scientific community is currently interested in the possible connection between oral chronic infection/inflammation and systemic health. The acknowledgment of a crosstalk linking microbiota, inflammation and oxidative stress, has attracted the attention of scientists to study the cyclic correlation between infection-related chronic inflammatory diseases and MetS.

3.3 Review:

Obesity is a multifactorial chronic disease characterized by fat accumulation in adipose tissue. There is an imbalance between intake and expenditure of energy. This condition triggers to metabolic adverse effects, such as hypertension, elevated cholesterol (LDL) and triglycerides, besides insulin resistance. Therefore, there is an increased risk for complications that may lead to incapacity or death¹⁹. Normal white adipose tissue (WAT) is mainly composed by adipocytes, with 10% of cells corresponding to macrophages (CD14+, CD33+), fibroblasts, endothelial cells and pre-adipocytes²⁰. This tissue has an important function of storing the dietary energy intake in a highly concentrated form: triglycerides. During an increased physical activity, triglycerides are released as free fatty acids, modulating energy expenditure. The adipose tissue is considered a secretory organ, by sending out and responding to chemical signals. The adipokines, namely adiponectin, and leptin, display a central role in the adipose tissue, being involved in glucose metabolism and appetite regulation, respectively²¹. All of the adipokines communicate with central and peripheral organs, such as skeletal muscles, brain, liver, pancreas, and small and large intestine¹⁹.

The obese WAT suffers continuous remodeling. Adipocytes are transformed in hypertrophied cells^{22,23}. Enlarged fat cells make adipose tissue dysfunctional and an unbalanced production of pro-inflammatory cytokines occurs. The angiogenesis is increased, the extracellular matrix is overproduced and a variety of immune cells, such as macrophages, is recruited. As much as inflammatory cells are present, more cytokines (TNF, IL-6) are secreted. Visceral WAT releases more pro-inflammatory cytokines, resulting

in additional fatty acids secretion. An increase in adipocyte numbers is also observed. This hyperplasia leads to effects in tissue homeostasis and WAT mass during a long life period. Even after severe weight loss, elevated adipocyte numbers are maintained. Thus, as much adipocytes are present in the fat tissue, more cytokine signaling exists around the body. Consequently, an inflammatory cycle is installed²⁴.

MetS is dependent on low-grade systemic inflammation caused by the immune response triggered by metabolic imbalance. The main inflammatory cells are M1 macrophages, CD8+ cells, Th1 cells, B cells, NK cells, and neutrophils. Leptin, tumor necrosis factor (TNF), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), C-reactive protein (CRP) and interferon γ (IFN γ) are pro-inflammatory cytokines that exert a relevant role in obesity. CXCL10, as a downstream chemokine for IFN γ , has an important role in suppressing insulin-dependent glucose uptake by lowering triglycerides in adipocytes, via inhibition of insulin-receptor substrate-1 (IRS-1). This is a key molecule in insulin signaling, leading to insulin resistance and development of type II diabetes^{25,26}.

Insulin resistance has a very close correlation to leptin, a molecule secreted by adipocytes. This adipokine is a modulator of T-cell function: it protects T cells from apoptosis, it regulates T-cell proliferation and activation, and it indirectly participates in the secretion of other cytokines. Leptin can suppress the proliferation of regulatory T lymphocytes (Tregs), which is a hint of primary effects of adipose visceral tissue inflammation^{27,28}. Leptin also participates in the activation, phagocytosis and cytokine production by monocytes. In obese individuals, leptin circulating levels are increased²⁹. Leptin-deficient mice display a decreased inflammatory state, whereas bacterial and viral

infections, as well as pro-inflammatory toxicity, are generally increased. In the endothelial cells, it leads to an up-regulation of adhesion molecules, enhancing the oxidative stress. Peripheral insulin resistance is also related to the increased levels of free fatty acids in the circulation, because of their capacity to impair insulin secretion³⁰.

TNF promotes insulin resistance via a direct phosphorylation of insulin receptors, finally inhibiting insulin signaling. Additionally, TNF leads to downregulation of adiponectin expression. This adipokine is present in normal levels in lean individuals, and it is found increased in anorexic ones. It has anti-inflammatory effects and regulates insulin sensitivity. In the case of obese and type 2 diabetic patients, as they are systemically inflamed, the levels of adiponectin are decreased. Apical periodontitis also elevates the plasmatic TNF levels, leading to an alteration in insulin signaling and sensitivity, emphasizing the prevention of this local disease to preclude insulin resistance^{31,32}.

The main anti-inflammatory cells are the M2 macrophages, eosinophils, besides Tregs and Th2 lymphocytes. Adiponectin, interleukin-22 (IL-22) and interleukin-10 (IL-10) are well known anti-inflammatory cytokines³³. When adipose tissue becomes obese, there is a change from M2 to M1 macrophage phenotype. The presence of M1 macrophages correlates with insulin resistance and obesity³⁴. This might be caused by increased levels of Th1 compared to Tregs and Th2 cells³⁵. When glycemia is controlled or insulin signaling is working normally, there is an increase in Th2-cell population³⁶. Oppositely, the influx of Th1 cells might be related to antigen-driven expansion²⁹.

As a persistent source of bacterial pathogens, the infected root canal constantly stimulates an inflammatory response in the area surrounding the dental root apex. The

destruction of periapical bone and connective tissues is also involved in the development of apical periodontitis³⁷. Initially, apical periodontitis attracts polymorphonuclear cells (PMNs) to the site of infection, killing bacteria by producing superoxide ions and oxidative burst. At low concentrations, these reactive oxygen species (ROS) are important for defense biological processes, stimulating the proliferation of fibroblasts and epithelial cells. However, at high concentrations, ROS cause tissue destruction. The ROS products further activate macrophages, neutrophils, and fibroblasts to generate additional ROS. The presence of pathogens induces ROS elevation and tissue destruction, under a positive feedback basis³⁸. In obese tissues, the excessive production of ROS and a lack of endogenous antioxidant capacity promotes an oxidation imbalance leading to oxidative stress in adipose cells, and maintenance of injury and cyclic inflammation³⁹. Adipose tissue oxidative stress is enhanced in both liver and adipose tissue, preceding the elevation of TNF and free fat acids in plasma and liver, what suggests that ROS may be an initial factor for inducing insulin resistance⁴⁰.

Bone metabolism is also affected by adipose tissue. Metabolic disorders rely on low-grade systemic inflammation, influencing bone regulatory cytokines. This is caused by key pro-inflammatory cytokines (such as IL-1 β and TNF), as a condition that clearly also happens during chronic apical periodontitis. Osteoclast precursors express a membrane catalytic receptor called RANK, which binds to circulating RANKL to activate the transcription factor NF- κ B, initiating the differentiation into active osteoclasts. The RANKL-RANK interaction can be inhibited by an endogenous decoy receptor named OPG (osteoprotegerin). Thus, the ratio RANKL/OPG is a critical factor in the regulation of

differentiation and activity of osteoclasts. Insulin signaling is essential for the production of osteocalcin and expression of RANKL by osteoblasts⁴¹. Conversely, insulin resistance has a negative effect on bone turnover. Osteoblast differentiation and proliferation is impaired and the low bone turnover leads to osteopenia⁴².

Together, metabolic disorders, in particular, obesity-related type 2 diabetes mellitus, negatively affect skeletal homeostasis, causing bone destructive conditions, such as rheumatoid arthritis and periapical/marginal periodontitis, with an increased risk of bone fractures, and delayed fracture healing. Bone loss in the periapical region is induced by cytokines derived from immune cells, which are activated by the polymicrobial infection process of apical periodontitis. There is a prevalence of gram-negative anaerobic microbiota that releases lipopolysaccharides (LPS) triggering an inflammation axis cascade. The recognition of LPS involves TLR4 activation in macrophages and neutrophils. IL-1 β , TNF, and IL-6 elicit inflammation, stimulate bone resorption by osteoclasts, and inhibit bone formation. The cytokines induce RANKL expression by osteocytes, osteoblasts, stromal cells, lymphocytes, and fibroblasts. Indeed, IL-1 β is considered the central mediator in the network by being strongly associated with the severity of periapical bone loss. Depending on the expression levels, IL-1 β may have a destructive potential of approximately 500-fold more than TNF. These cytokines may be released into the systemic circulation, inducing or perpetuating the systemic inflammatory state⁴³.

Bacteria are also related to the systemic subclinical inflammatory state in obese individuals. This cyclic condition is not only related with an excessive caloric intake. The gut microbiota is a strong regulator of inflammation stasis. Human microbiota is

composed of approximately 100-trillion bacteria. This microbiota has an important role in host homeostasis⁴⁴. However, an equilibrium maintenance is necessary to prevent the perpetuation of the inflammatory state⁴⁴. Recently, gut microbiota dysbiosis has been pointed out as a trigger of metabolic disorders^{46,47,48}.

Intestinal microbiome is important for immune system development and for fermentation of plant polysaccharides, which are non-digestible carbohydrates. However, it is well known that, depending on the type of bacteria, gut microbiome largely interferes in the efficiency of energy intake. Many germ-free mouse studies indicated that manipulation of dietary energy greatly alters the microbiome^{49,50,51}. Moreover, obese microbiota demonstrated to be more efficient in gathering energy from diet than lean microbiota.

The biological adaption for obese and insulin-resistant individuals also occurs in bowel. Normal gut luminal contents include mucus, innate immune cells (such as macrophages and neutrophils), intestinal epithelial cells, Paneth cells (producing α -defensin and innate lymphoid cells - ILCs), Tregs and IgA^{52,33}. Gut microbiota can induce inflammation, and the bowel is the front defense against infection; the innate immune system detects non-self signals by recognizing small components of the microorganisms. LPS from gram-negative bacteria, lipoteichoic acids (LTA) from gram-positive bacteria, and peptidoglycans from both gram-positive and gram-negative bacteria are examples of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). The recognition of PAMPs is done by sensors called pattern recognition receptors (PRRs), like toll-like receptors (TLRs)⁵³ and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs). These receptors

bind to PAMPs, in addition to endogenous danger-associated molecular patterns (DAMPs), including ATP, glucose and β -amyloid protein⁵⁴.

The intestine wall is coated with mucus. The inner layer has anti-microbial peptides (AMPs) and microorganisms colonize the outer layer. The most common bacterial species are from phyla *Firmicutes* and *Bacteroidetes* (about 70-75% of total)⁵⁵. The most predominant genera include *Bifidobacterium* and *Bacteroidetes* ssp. which can metabolize mucin glycans to produce short-chain fatty acids (SCFAs)⁵⁶. Gut microbiota synthesizes a large arsenal of glycoside-hydrolases, making possible to process the complex dietary carbohydrates into monosaccharides and SCFAs, such as acetate (substrate for cholesterol synthesis), propionate (affects hepatic lipogenesis and glycogenesis)⁵⁷ and butyrate (it maintains the intestinal integrity and prevents from endotoxemia by increasing differentiation of Treg cells)^{58,16}.

A high-fat diet is based on lipid abundance. When lipids enter the gut lumen, they provoke a stressful response on the intestinal epithelium, causing a temporary damage to the epithelial cell junction⁵⁹. The intestine wall becomes permeable and antigenic material (i.e. LPS) from a changed gut microbiota (from a symbiotic population mainly composed by *Bifidobacterium* and *Bacteroidetes* to a dysbiotic one mainly composed by *Firmicutes* and *Porphyromonadaceae*)^{60,61,62,63,64} is taken within the lipids. From this barrier opening, an inflammatory immune response is induced. Under pathogenic invasion or increased bowel permeability, PAMPs induce the secretion of IL-1 β , IL-6, IL-12, interleukin-18 (IL-18) and/or interleukin (IL-23) by intestinal epithelial cells, dendritic cells and macrophages⁵². In contrast, IL-10 produced by macrophages, Th2 and Tregs strongly suppress

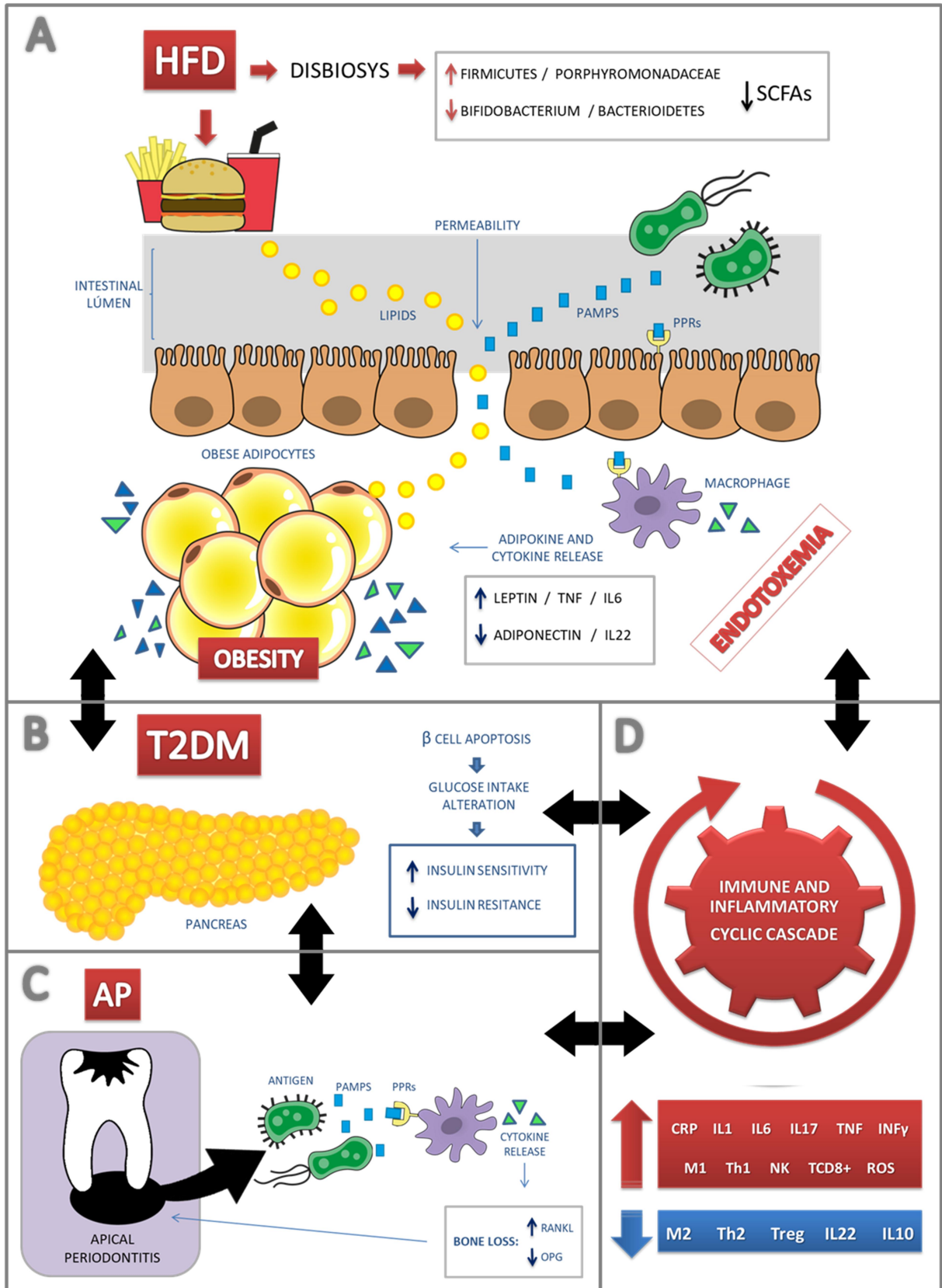
inflammation response induced by TLR4 signaling. IL-10 also has a strong inhibitory effect on periapical inflammation and bone destruction⁶⁵. Then, stimulation signaling by PAMPs and low-grade systemic inflammation leads to the absence of this key cytokine and peripheral insulin resistance is installed⁶⁶.

Even with the epithelial barrier, the intestine can carry into the body toxic bacterial products¹⁶. In apical periodontitis, the anatomic proximity with the bloodstream can favor bacteremia during the treatment⁴³. Endodontic infections are associated with a complex microbiota, as no epithelial barrier is found between the infected root canal and the highly vascularized granulomatous tissue in the apex. Despite the lack of scientific studies about this issue, a meta-analysis study suggested that serum levels of IgA, IgG, and IgM are increased in humans with apical periodontitis, in comparison with control individuals¹⁸. A systemic spread of bacterial products may occur, as well as the dissemination of inflammatory mediators and immune complexes, with a probable induction and/or perpetuation of systemic adverse effects.

3.4 Conclusion:

Herein, we provide a literature overview regarding the relationship among metabolic alterations, periapical infection and low-grade inflammation. Pathogens initiate endodontic infection, which leads to apical periodontitis. This local disease, with bone destruction, triggers inflammatory responses in bloodstream. Gut microbiota altered by high fat diet also causes low-grade inflammation, with obesity and diabetes as consequence. A cyclic cascade feeds the endotoxemia and AP may be another foe in this pernicious process. Chronic cytokine release is likely the pivotal mechanism that links AP with dysbiosis, obesity and diabetes. The scheme depicted in Figure 1 summarizes the cyclic inflammatory response linking apical periodontitis, metabolic diseases and dysbiosis. Novel multidisciplinary approaches should be explored in order to manage the deleterious silent consequences of low-grade inflammation more efficiently.

Figure 1 – Manuscript I



3.5 Legend to the Figure 1 - Manuscript I

Diagram illustrating the cyclic activation of inflammatory cascade in the presence of metabolic diseases and apical periodontitis (AP). (A) HFD (High Fat Diet) causes a dysbiotic state in the intestinal lumen, increasing the number of *Firmicutes* and *Porphyromonadaceae* and decreasing the number of *Bifidobacterium* and *Bacteroidetes*. Lipids from the HFD induce an increase of barrier permeability by affecting the intestinal epithelial cells, which allows the entrance of PAMPs (Pathogen-associated Molecular Patterns) to the bloodstream. Lipids induce adipocytes to become obese and to release adipokines. PAMPs are recognized by PRRs (Pattern Recognition Receptors) expressed by intestinal and immune cells, such as macrophages. Pro-inflammatory cytokines favor systemic endotoxemia, and a cyclic cascade is activated (D), with damage to pancreatic β -cells, and consequent glucose intake alterations and insulin resistance (B). (C) PAMPs from AP-related bacteria promotes activation of PRRs in defense cells triggering a local bone loss, with an amplification of the inflammatory cyclic cascade (D).

3.6 References:

1. World Health Organization (WHO). Global Health Observatory (GHO) – Overweight. Acesso em: 07/10/2017. http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_text/en/
2. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data (2011). Global status report on noncommunicable diseases 2010.
3. Marchetti E, Monaco A, Procaccini L, Mummolo S, Gatto R, Tetè S, et al. Periodontal disease: the influence of metabolic syndrome. *Nutr Metab (Lond)*. 2012 Sep 25;9(1):88.
4. Doxey DH, Cutler CW, Iacopino AM. Diabetes Prevents Periodontitis-Induced Increases in Gingival Platelet Derived Growth Factor-B and Interleukin 1-Beta in a Rat Model. *J Periodontol*. 1998 Feb;69(2):113-9.
5. Grossi SG. Treatment of periodontal disease and control of diabetes: an assessment of the evidence and need for future research. *Ann Periodontol*. 2001 Dec;6(1):138-45.
6. Kuramitsu HK, Qi M, Kang I, Chen W. Role for periodontal bacteria in cardiovascular Disease. *Ann Periodontol*. 2001 Dec;6(1):41-7.
7. Gurav A, Jadhav V. Periodontitis and risk of diabetes mellitus. *J Diabetes*. 2011 Mar;3(1):21-8.
8. Matilla K, Vesanen M, Valtonen V, Nieminen M, Palosuo T, Rasi V, et al. Effect of treating periodontitis on C-reactive protein levels: a pilot study. *BMC Infect Dis*. 2002 Dec 10;2:30.

9. Pasqualini D, Bergandi L, Palumbo L, Borraccino A, Dambra V, Alovise M, et al. Association among oral health, apical periodontitis, CD14 polymorphisms, and coronary heart disease in middle-aged adults. *J Endod.* 2012 Dec;38(12):1570-7.
10. Um YJ, Jung U, Kim C, Bak E, Cha J, Yoo Y, et al. The influence of diabetes mellitus on periodontal tissues: a pilot study. *J Periodontal Implant Sci.* 2010 Apr;40(2):49-55.
11. Xiao S, Zhao L. Gut microbiota-based translational biomarkers to prevent metabolic syndrome via nutritional modulation. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014 Feb;87(2):303-14.
12. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science.* 2013 Sep 6;341(6150):1241-1244.
13. An HM¹, Park SY, Lee DK, Kim JR, Cha MK, Lee SW, et al. Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. in high fat diet-induced obese rats. *Lipids Health Dis.* 2011 Jul 12;10:116.
14. Chen JJ, Wang R, Li X-F & Wang R-L. *Bifidobacterium longum* supplementation improved high-fat-fed-induced metabolic syndrome and promoted intestinal Reg I gene expression. *Exp Biol Med (Maywood).* 2011 Jul;236(7):823-31.
15. Fäk F, Bäckhed F. *Lactobacillus reuteri* prevents diet-induced obesity, but not atherosclerosis, in a strain dependent fashion in *Apoe*^{-/-} mice. *PLoS One.* 2012;7(10):e46837.
16. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes.* 2007 Jul;56(7):1761-72.

17. 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.
18. Gomes MS, Blattner TC, Sant'Ana Filho M, Grecca FS, Hugo FN, Fouad AF, et al. Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? A systematic review and meta-analysis. *J Endod.* 2013 Oct;39(10):1205-17.
19. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J.* 2008 Dec;29(24):2959-71.
20. Majka SM, Barak Y, Klemm DJ. Concise review: adipocyte origins:weighing the possibilities. *Stem Cells.* 2011 Jul;29(7):1034-40.
21. Faintuch J, Horie LM, Barbeiro HV, Barbeiro DF, Soriano FG, Ishida RK, et al. Systemic inflammation in morbidly obese subjects: response to oral supplementation with alpha-linolenic acid. *Obes Surg.* 2007 Mar;17(3):341-7.
22. Hirsch, J. & Batchelor, B. Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab.* 1976 Jul;5(2):299-311.
23. Faust IM, Johnson PR, Stern JS, Hirsch J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am J Physiol.* 1978 Sep;235(3):E279-86.
24. Jeffery E, Church CD, Holtrup B, Colman L, Rodeheffer MS. Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity. *Nat Cell Biol.* 2015 Apr;17(4):376-85.

25. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8):914-20.
26. Yan XW, Li WQ, Wang XD, Li JS, Li N. Effects of insulin receptor substrate-1 and its serine phosphorylation and tyrosine phosphorylation on insulin resistance in skeletal muscle cells in the state of sepsis: experiment with rats. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2006 Nov 7;86(41):2922-7.
27. De Rosa V, Procaccini C, Cali G, Pirozzi G, Fontana S, Zappacosta S, et al. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation. *Immunity*. 2007 Feb;26(2):241-55.
28. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8):930-9.
29. Sell H, Habich C, Eckel J. Adaptive immunity in obesity and insulin resistance *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Dec;8(12):709-16.
30. Hostamisgil GS. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Dec;32 Suppl 7:S52-4.
31. Astolphi RD, Curbete MM, Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, Prieto AK, et al. Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. *J Endod*. 2013 May;39(5):648-52.
32. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol*. 2004 Jan;25(1):4-7.

33. Zhou L. AHR function in lymphocytes: emerging concepts. *Trends Immunol.* 2016 Jan;37(1):17-31.
34. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):175-84.
35. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med.* 2009 Aug;15(8):921-9.
36. Viardot A, Lord RV, Samaras K. The effects of weight loss and gastric banding on the innate and adaptive immune system in type 2 diabetes and prediabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Jun;95(6):2845-50.
37. Bergenholtz G. Effect of bacterial products on inflammatory reactions in the dental pulp. *Scand J Dent Res.* 1977 Jan-Feb;85(2):122-9.
38. Dahiya P, Kamal R, Gupta R, Bhardwaj R, Chaudhary K, Kaur S. Reactive oxygen species in periodontitis. *J Indian Soc Periodontol.* 2013 Jul;17(4):411-6.
39. Ruskovska T, Bernlohr DA. Oxidative stress and protein carbonylation in adipose tissue – implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *J Proteomics.* 2013 Oct 30;92:323-34.
40. Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet induced insulin resistance and obesity. *Metabolism.* 2008 Aug;57(8):1071-7.
41. Yan ZQ, Hansson GK. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. *Immunol Rev.* 2007 Oct;219:187-203.

42. Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, Rao DS, Whitehouse FW, Parfitt AM. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes*. 1995 Jul;44(7):775-82.
43. Sasaki H, Hirai K, Martins CM, Furusho H, Battaglino R, Hashimoto K. Interrelationship between Periapical Lesion and Systemic Metabolic Disorders. *Curr Pharm Des*. 2016;22(15):2204-15.
44. Xu J, Mahowald MA, Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Martens EC, et al. Evolution of Symbiotic Bacteria in the distal Human Intestine. *PLoS Biol*. 2007 Jul;5(7):e156.
45. Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Minireview: Gut microbiota: The neglected endocrine organ. *Mol Endocrinol*. 2014 Aug;28(8):1221-38.
46. Cani PD, Delzenne NM, Amar J, Burcelin R. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathol Biol (Paris)*. 2008 Jul;56(5):305-9.
47. Sirisinha S. The potential impact of gut microbiota on your health: Current status and future challenges. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2016 Dec;34(4):249-264.
48. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 2010 Jul;90(3):859-904.
49. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1027-31.
50. Tilg H, Kaser A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *J. Clin. Invest. J Clin Invest*. 2011 Jun;121(6):2126-32.

51. Delzenne NM, Neyrinck AM, Cani PD. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. *Microb Cell Fact*. 2011 Aug 30;10 Suppl 1:S10.
52. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*. 2012 Sep 13;489(7415):231-41.
53. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:219-46.
54. Janket SJ, Ackerson LK. What is passing through toll-gate 4. *Arch Oral Biol*. 2015 Apr;60(4):664-6.
55. Cresci GA, Bawden E. Gut microbiome: what we do and don't know. *Nutr Clin Pract*. 2015 Dec;30(6):734-46.
56. Hartstra AV et al. insights into the role of the microbiome in obesity and type II diabetes. *Diabetes care* 2015; 38:159-165.
57. Schwiercz A, Taras D, Schäfer K, Beijer S, Bos NA, Donus C, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)*. 2010 Jan;18(1):190-5.
58. Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Feb;6(2):121-31.
59. Kvietys PR, Specian RD, Grisham MB, Tso P. Jejunal mucosal injury and restitution: role of hydrolytic products of food digestion. *Am J Physiol*. 1991 Sep;261(3 Pt 1):G384-91.
60. Portela-Cidade JP, Borges-Canha M, Leite-Moreira AF, Pimentel-Nunes P. Systematic review of the relation between intestinal microbiota and toll-like receptors in the

- metabolic syndrome: what do we know so far? *GE Port J Gastroenterol.* 2015 Aug 14;22(6):240-258.
61. Tilg H, Moschen AR. Food, immunity, and the microbiome. *Gastroenterology.* 2015 May;148(6):1107-19.
62. De Rosa V, Galgani M, Santopaolo M, Colamatteo A, Laccetti R, Matarese G. Nutritional control of immunity: balancing the metabolic requirements with an appropriate immune function. *Semin Immunol.* 2015 Sep;27(5):300-9.
63. Xu Z, Knight R. Dietary effects on human gut microbiome diversity. *Br J Nutr.* 2015 Jan;113 Suppl:S1-5.
64. Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol.* 2011 Jan;12(1):5-9.
65. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol.* 2014 Jul;16(7):1024-33.
66. Sasaki H, Suzuki N, Kent R Jr, Kawashima N, Takeda J, Stashenko P. T cell response mediated by myeloid cell-derived IL-12 is responsible for *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in IL-10-deficient mice. *J Immunol.* 2008 May 1;180(9):6193-8.

4. CAPITULO II

Manuscrito 2

O artigo a seguir intitula-se “**Crosstalk between apical periodontitis and metabolic disorders: experimental evidence on the role of intestinal adipokines and *Akkermansia muciniphila***” e foi submetido à revista Journal of Endodontics (fator de impacto 2,788; Área de Odontologia, Quadriênio 2013-2016, CAPES).

Crosstalk between apical periodontitis and metabolic disorders: experimental evidence on the role of intestinal adipokines and *Akkermansia muciniphila*

Cauana O. Tavares^{1,3}, Fernanda L. Rost^{2,3}, Rodrigo B. M. Silva^{3,4}, Ana Paula Dagnino^{3,5}, ,
Bruno Adami⁵, Helena Schirmer⁶, José Antônio P. de Figueiredo², André Arigony Souto⁵,
Fábio Dal Moro Maito⁷, Maria M. Campos^{1,2,3,4,5,7}

¹PUCRS, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Escola de Ciências da Saúde, Porto Alegre/RS, Brasil;

²PUCRS, Programa de Graduação em Odontologia, Escola de Ciências da Saúde, Porto Alegre/RS, Brasil;

³PUCRS, Centro de Toxicologia e Farmacologia, Escola de Ciências da Saúde, Porto Alegre/RS, Brasil;

⁴PUCRS, Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Escola de Medicina, Porto Alegre/RS, Brasil;

⁵PUCRS, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Escola de Ciências, Porto Alegre/RS, Brasil;

⁶Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde (UFCSPA);

⁷PUCRS; Laboratório de Patologia Bucal, Escola de Saúde, Porto Alegre/RS, Brasil.

Corresponding author: Maria M. Campos, Escola de Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Partenon, 90619-900, Porto Alegre, Brazil. Phone number: +55 51 3320 3562; Fax number: +55 51 3320 3626; Email: camposmmartha@yahoo.com; maria.campos@pucrs.br.

Acknowledgments

C.O.T.; R.B.M. and A.P.D. are PhD Students supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES). M.M.C. is a researcher career awardee of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 303842-2014-8). We would like to thank Mrs. Janaína Pasetti Nunes for her excellent technical assistance. The authors deny any conflicts of interest related to this study.

4.1 Abstract

Introduction: Infection and dysbiosis present a close relationship with metabolic diseases, although the influence of apical periodontitis (AP) in this context needs further investigation. This study evaluated the influence of AP in a rat model of metabolic disorder induced by 10% fructose supplementation. **Methods:** Male Wistar rats were used. Animals that received high fructose diet (HFD; N=30) or filtered water (control; N=30) were subdivided into additional groups: (i) without induction of AP (N=20); (ii) with AP induction 2 weeks before euthanasia (14 days; N=20); (iii) with AP induction 4 weeks before euthanasia (28 days; N=20). **Results:** HFD triggered obesity-related type2 diabetes, as indicated by induction of overweight and hyperglycemia, besides polydipsia, regardless of the AP induction. There was no variation in the serum or intestinal levels of TNF, IL-1 β and IL-6 among the experimental groups. Serum leptin and adiponectin levels were significantly elevated in the HFD group, without AP induction. The intestinal levels of leptin were significantly increased in the groups with 28 days of AP induction, despite HFD. A significant elevation of liver glutathione levels was observed in animals submitted to HFD and AP for 14 days. AP induction (14 or 28 days) led to pulp and periapical tissue inflammation, without any influence of HFD. Either HFD or AP induction led to dysbiosis, as indicated by a significant reduction of fecal *A. muciniphila* expression. **Conclusion:** We provide novel evidence that AP can have systemic impacts on metabolic disorders, likely by modulating intestinal metabolism and microbiota.

Key words: Apical periodontitis, Obesity, Type 2 Diabetes, *Akkermansia muciniphila*, Fructose, Gut.

4.2 Introduction

Obesity is an alarming disease with epidemic proportions: the estimates indicate that more than 600-million individuals are obese and 2-billion are overweight worldwide (1). Obesity and overweight are closely related to metabolic diseases, such as diabetes and hypertension, representing a serious public health problem, with elevated morbidity and mortality (2). The increased rates of obesity over the past years is probably a reflex of dietary habits and lifestyle (3). Studies have been gradually demonstrating the strong correlation between obesity and altered gastrointestinal microbiota (4-8). Fat intake dramatically modifies the gut microbiota, what greatly disturbs the host metabolism, triggering low-grade inflammation (9-10). When an unbalance is installed, the microbiota undergoes dysbiosis, leading to an elevated susceptibility for metabolic diseases (11). Fat intake also enhances the permeability for bacterial toxins (mainly lipopolysaccharide - LPS from gram-negative bacteria) through the gut cell barrier into the bloodstream. Toxin invasion elicits endotoxemia, maintaining the inflammatory state, turning into a cyclic condition (6).

Among the diversity of gut microbiome, the *Akkermansia muciniphila* is one of the most abundant single species (0.5–5% of the total bacteria) (12,13). This species has been calling attention due to its contribution for host protection, presenting an inverse correlation with inflammation, diabetes, and altered adipose tissue metabolism (14). Of note, animals treated with *A. muciniphila* showed a reduction of body weight and

glycemia (15), and therefore, these bacteria have been pointed out as candidates for development of novel food or pharma supplements (16).

The close relationship between obesity, low-grade inflammation and microbiota sparked our interest to evaluate the role of apical periodontitis (AP), in the outcome of systemic metabolic diseases. AP is associated with a complex microbiota and a high-vascularized granulomatous tissue. As this lesion has no epithelial barrier, oxidative stress products and inflammatory cytokines can easily reach the bloodstream (17). A meta-analysis demonstrated that serum levels of IgA, IgG, and IgM are increased in humans with AP, in comparison with control individuals, suggesting the occurrence of systemic adverse effects (18).

The available literature has numerous studies about periodontitis and its systemic repercussion (19-21). However, there is a lack of scientific studies upon AP and its systemic effects. Thus, the present study investigated the crosstalk between systemic inflammatory changes and intestinal dysbiosis, and their correlation with AP outcomes in a rat model of metabolic disorder induced by high-fructose diet.

4.3 Material and methods

Animals

Male Wistar rats (8-weeks-old, total N = 60 animals), weighing 240 to 280 g at the onset of experiments, were obtained from the Central Animal House of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CeMBE; PUCRS; Brazil). The animals were housed under standard conditions of temperature (22 ± 2 °C), light (12-h light-dark cycle) and humidity (50 - 70 %), in ventilated cages, with autoclaved wood chip bedding. They received a standard rat chow diet (Nuvilab®), with free access to filtered water or 10% fructose solution, depending on the experimental group. The experimental protocols followed the current Brazilian guidelines for the care and use of animals for scientific and didactic procedures, from the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, Brazil). The local Animal Ethics Committee evaluated and approved all the protocols (CEUA 14/00428). We followed the ARRIVE Guidelines to report *in vivo* experiments (22). The number of animals and the intensity of noxious stimuli were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects.

Induction of obesity-related type 2 diabetes and experimental groups

Obesity-related type 2 diabetes was induced as described previously (23). The rats received 10% fructose in the drinking water during 8 weeks. Control animals received filtered water during the same period. Rats and chow were weighted (g) three times a week. The water was refilled and the consumed volume (ml) was measured every day; the

results were pooled weekly. Glucose levels were measured at the end of experiments with a digital glucometer (Accu-Check III, Boehringer Mannheim, Germany). Animals submitted to high fructose diet (HFD; N=30) or normal diet (control; N=30) were subdivided into additional experimental groups: without induction of AP (N=20); with AP induction 2 weeks before euthanasia (14 days; N=20); with AP induction 4 weeks before euthanasia (28 days; N=20).

AP rat model

AP induction was accomplished as previously described (24). Animals were anesthetized by an intraperitoneal injection of xylazine (10 mg/kg) plus ketamine (100 mg/kg). The pulp of the mandibular first left molar was surgically exposed with a ¼-size round steel bur in high-speed rotation under constant irrigation. Pulp was left exposed to the oral environment for 14 or 28 days, according to the experimental group, as described before, to allow establishment of AP (24-26).

Assessment of cytokines and adipokines

The animals were euthanized 8 weeks after the onset of HFD by deep anesthesia with sevoflurane. Serum and ≈3 cm of large intestine were collected to evaluate the levels of tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), leptin and adiponectin. The samples were stored at -80°C until used. Cytokines and adipokines were analyzed by sandwich ELISA using DuoSet® kits according to the manufacturer's

instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The results are expressed in pg/ml or pg/mg tissue, for serum and intestine, respectively.

Determination of oxidative stress

After euthanasia, the livers and hearts were immediately collected for determination of catalase and reduced glutathione (GSH) activities, two classical indicators of tissue oxidative stress, as described before (34).

Histopathologic analysis

To confirm the induction of tooth pulp inflammation, the mandibles were collected and fixed in 10% neutral-buffered formalin solution. The samples were decalcified with 17% EDTA (pH 7.0). The paraffin blocks containing the maxillae were serially cut (six μm -thickness) in the longitudinal plane. The sections were stained with H&E, and examined under light microscopy. A microscope (Axio Imager A1) coupled to an image capture system (Axio Vision Rel. 4.4 Software Multimedia), from Carl Zeiss (Hallbergmoos, Germany) was used (x200 magnification). Histological analysis included the pulp and periapical areas. The quantitative analysis of the periapical region was accomplished using the methodology described before (27). The pulp alterations were evaluated qualitatively. Two skilled pathologists blinded to the experimental groups revised all analysis.

Evaluation of fecal *A. muciniphila*

The day before the euthanasia, ≈ 4 g of feces were collected from each animal. Cellular DNA was extracted using the Wizard[®] Genomic Purification (Promega) according to the protocol suggested by the manufacturers. One mL of the extracted DNA was used in a total volume of 12.5 mL of PCR mix GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega). The primer used to amplify *A. muciniphila* was F: 5'AGGCGGAGGAAATCCTAAAA -3' and R: 5'GCGGTTGGCTTCAGATACTT -3', which correspond to nucleotides 1231 – 1250 (sense) and 1395 – 1414 (antisense) (accession number NR_074436.1) in a concentration of 0.64 micromoles per reaction. The qPCR amplification was confirmed with the amplicon by melting curves analysis (T_M 88.7). The specific parameters of the primers for bacterial detection were evaluated by the BLAST search program. Negative (0.9% sodium chloride) and positive controls (the oligo sequence design according the sequence of the primers) were used in each qPCR. To evaluate the concentration of bacteria and the limit of detection, a serial dilution was made with the positive control, with concentrations varying from 10⁴ to 10⁷. All samples were analyzed in duplicate. To confirm that the amplified product was from *A. muciniphila*, we carried out a specific control sequencing for this bacterium.

Statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm the standard error mean of 10 animals in each experimental group. Data was subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-hoc test (GraphPad Software In, San Diego, CA). *P* values

less than 0.05 were considered statistically significant. The variations in the experimental N due to sample limitations are described in each legend to figure.

4.4 Results

Herein, we used a model of obesity-related type 2 diabetes, induced by the supplementation with 10% fructose (HFD), to evaluate the crosstalk between metabolic changes and AP in rats. Regarding the general metabolic alterations, the groups submitted to HFD for eight weeks displayed an increase of body weight gain, irrespective of the AP induction. The increased body weight gain in HFD groups was significant from 40 days after the onset of experiments, when compared to control animals, with or without AP (Figure 1A). HFD elicited hyperglycemia in all animals submitted to the HFD, confirming the induction of type 2 diabetes (Figure 1B). This evidence was supported by data showing an increase of water intake in HFD groups, regardless of the AP intervention (Figure S1A-D).

Next, we examined the serum and intestinal levels of cytokines and adipokines. The pro-inflammatory cytokines, namely TNF, IL-1 β and IL-6 were undetectable in either the serum or intestine of any experimental group (data not shown). However, there was a significant increase in the serum levels of the adipokine leptin in the HFD group, without AP induction (Figure 2A). Moreover, the intestinal levels of leptin were significantly increased in the groups with 28 days of AP induction, regardless of the supplementation with 10% fructose (Figure 2B). The levels of adiponectin were significantly increased in the serum of HFD group, without AP induction (Figure 2C), although no variation in the intestinal levels of this adipokine was noticed in any other groups (Figure 2D). Considering the relationship between metabolic diseases and oxidative stress, we also assessed the

activities of catalase and glutathione in the liver and heart. No significant alteration was seen when comparing the different experimental groups, except by a significant elevation of glutathione levels in the liver of animals submitted to HFD and AP for 14 days (Figure S2A-D).

Considering the induction of AP, the histological analysis indicated that control groups (without coronal opening) showed no alterations in the pulp or periapical tissues (Figure 3A, B). Noteworthy, 100% of these teeth presented healthy pulp and periapical tissues, without any significant effect of HFD (Figure 3G). Those teeth submitted to coronal opening (14 or 28 days opening) showed necrosis in the coronal region in 100% of the cases (Figure 3C, E). Additionally, the groups with 28 days of AP induction showed root pulp necrosis in 100% of the cases (Figure 3E, F), apart from the supplementation with 10% fructose. Data analysis revealed a time-related increase of periapical inflammation, with mild periapical inflammation at 14 days, and intense periapical inflammation at 28 days (Figure 3G).

The fecal expression of *A. muciniphila* was reduced in all the experimental groups with HFD, with or without AP induction, in relation to the control animals. This decline was significant in animals that received 10% fructose supplementation, and had been submitted to pulp exposure for 14 and 28 days. The groups with pulp exposure for 14 or 28 days, without HFD, also displayed a significant reduction of *A. muciniphila* expression in feces (Figure 4).

4.5 Discussion

Oral cavity infections, especially periodontal diseases, have been calling attention along the last years by their systemic impacts (19,20,21). AP is a chronic disease with a persistent source of infection in the dental root apex, which needs endodontic intervention to allow tissue healing (26). In this lesion, the bone is reabsorbed and a chronic inflammatory response, with a high-vascularized granulomatous tissue formation, takes the space of the normal periapical tissue. In the absence of an epithelial barrier, systemic repercussions can be expected (18). This study investigated the influence of AP in a model of metabolic disease induced by long-term ingestion of fructose in rats. For this purpose, we investigated the influence of AP on inflammation, oxidative stress and dysbiosis related to metabolic disorder, as well as the influence of fructose-induced metabolic syndrome on AP development. The present findings carry significance on the potential systemic repercussions of AP.

Our data show that 10% fructose supplementation, for 8 weeks, was able to induce obesity-related type 2 diabetes in rats. This model is well accepted and it has been widely used for investigating the complications related to metabolic syndrome in rodents (28-30). Accordingly, HFD leads to obesity, hypertension and glucose metabolism dysregulation (29,31). It can be induced experimentally by feeding rats with a 60% fructose-rich diet (30,32,33), or either by adding 10% fructose to drinking water (23). Herein, we opted for adding fructose 10% in water, because it seems that 60% fructose in diet promotes satiety earlier, and the rats have less daily food intake and gained significantly less weight (30).

Furthermore, male rats were used in this study, since females fail to develop fructose-induced insulin resistance (33).

Data show that fructose supplementation induced marked body weight gain, which was more evident within \approx 6 weeks of experiments, even with a decrease in average food intake in the HFD groups, since the 3rd week. Moreover, the glycaemia levels were increased and the water consumption was higher in all HFD groups, when compared to controls, from the beginning of the experiments, confirming diabetes-related polydipsia (23). From the present results, it is possible to conclude that AP induction did not alter fructose-induced type 2 diabetes features, such as overweight, hyperglycemia or polydipsia. Conversely, it was demonstrated that periodontitis induction impaired glucose metabolism and insulin resistance in Zucker prediabetes fatty rats (34,35). Nevertheless, AP and periodontitis display different pathogenesis and progression, what might partly justify the present discrepancy. Furthermore, genetic models of diabetes greatly differ from diet models as the one used by us.

As a next step, we evaluated the effects of HFD and AP induction on serum and intestinal levels of cytokines and adipokines. TNF, IL-1 β and IL-6 are well known pro-inflammatory cytokines that exert a relevant role in local AP development, besides obesity and type 2 diabetes (36,37). In this study, we did not observe any difference in the levels of these cytokines, in either serum or intestine, in any experimental group, confirming previous studies (38-40). Moreover, a meta-analysis evaluating the correlation between human AP and the serum levels of inflammatory markers did not indicate any differences in TNF, IL-1 β and IL-6 levels, despite an increase of IgA, IgG and IgM production (18).

The adipose tissue itself can synthesize pro-inflammatory cytokines, named adipokines, such as leptin and adiponectin (37). Leptin is increased in obese individuals and is present under pro-inflammatory states (36). Adiponectin has an opposite role; it has anti-inflammatory effects and regulates insulin sensitivity (41). We found an increase in serum leptin and adiponectin levels in the HFD group compared to control animals. Additionally, there was an increase of intestinal leptin levels in groups with AP induction for 28 days, an effect that tended to be higher in animals submitted to HFD. An elevation of serum leptin levels in animals submitted to HFD was quite expected, whereas the adiponectin raise might represent a compensatory response to overcome leptinemia (42). However, to our knowledge, this is the first experimental evidence showing that AP induction alters the intestinal leptin levels. Upholding partly our data, periodontitis induction in a rat model of spontaneous type 2 diabetes led to an elevation of serum leptin levels, when compared to diabetic rats without periodontal disease (43).

A previous study from our group demonstrated a significant alteration of glutathione activity in the livers of animals submitted to chronic intake of 20% glucose solution and AP induction for 21 days (24). Here, the induction of liver oxidative stress was observed only in animals submitted to HFD and AP for 14 days, as indicated by an increase in glutathione levels. The other experimental groups with HFD only, or HFD plus AP for 28 days did not display any significant change of this parameter. Accordingly, a previous study also showed unaltered glutathione or catalase activity in the liver of fructose-supplemented rats (44). This might suggest that liver oxidative stress is an early event when metabolic disease and AP are present, preceding the intestinal adipokine changes.

The present study also evaluated the possible influence of fructose-elicited metabolic syndrome on AP development. For this purpose, we employed the classical AP model induced by the first molar tooth pulp exposure to the oral environment, for 14 and 28 days (45). Herein, we observed healthy pulp and periapical tissues in those groups without coronal opening, despite the fructose supplementation. On the other hand, after 14 days of AP induction, it was possible to observe necrotic coronal pulp tissue and mild inflammation at the periapical area. After 28 days of AP induction, the pulp tissues were necrotic, with severe periapical inflammation, with bone resorption and the presence of abscess in most samples. The present set of results indicates a time-dependent progress of AP-related inflammation. This is in accordance with the previous notion suggesting that severity of endodontic infection determines the inflammation grade (46). However, HFD did not influence the extent of pulp or periapical inflammation at 14 or 28 days. It is tempting to conclude that AP leads to systemic alterations associated with metabolic disorders, but the induction of obesity-related type 2 diabetes by fructose ingestion did not affect the progression of AP, at least at the present experimental conditions.

Non-communicable diseases, such as obesity and type 2 diabetes, and the increased susceptibility to infections, have currently been associated to diet lifestyle and disruption of gut microbiota (47). The predominant bacterial phyla in bowel are *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* and *Proteobacteria* (48). Another phyla present in minor extent is the *Verrucomicrobia*, which encompasses the gram-negative bacteria *Akkermansia muciniphila* (49). *A. muciniphila* resides at the gut mucus layer, and its levels are inversely correlated with the presence of metabolic diseases and chronic inflammation

(50). Moreover, these bacteria are present in healthy subjects controlling fat storage, adipose tissue inflammation and glucose metabolism, with overall favorable metabolic effects (15). Our results demonstrated a reduction of fecal *A. muciniphila* levels in all the experimental groups with HFD and/or AP induction. A decrease of *A. muciniphila* expression might be predictable in groups submitted to HFD, as these bacteria are downregulated under metabolic diseases and inflammatory alterations (15,47). However, as far as we know, this is the first experimental evidence showing the influence of AP on fecal *A. muciniphila* expression. Many pathogens are involved in AP, like gram-negative bacteria that can produce LPS. This bacterial product is able to uphold a pro-inflammatory status (51). It has been proposed that the number of diseased teeth shows a positive correlation with the extension of systemic involvement (52,53), which lead us to propose that as more LPS from AP, more systemic inflammation takes place, which might consequently reduce the *A. muciniphila* expression.

4.6 Conclusion

We provide evidence that AP is able to alter systemic parameters related to metabolic disorders, by showing that AP *per se* leads to intestinal leptinemia and dysbiosis. Oppositely, HFD-induced metabolic changes did not appear to modulate AP progression, at least in our experimental paradigm. Future animal studies are needed to investigate whether extended protocols of fructose supplementation might affect AP outcomes, besides the influence of fructose-induced metabolic changes on periapical tissue healing.

4.7. Figures and Legends – Manuscript II

Figure 1. (A) Time-related body weight changes in control or HFD groups. Dotted lines represent interventions to induce AP at 28 days or 14 days. (B) Glycaemia levels at the end of experiments. **Significant difference in relation to control group, ($P < .01$); ***Significant difference in relation to control AP 28 days ($P < .01$). The columns represent the mean of 10 animals and the vertical lines indicate the standard error of mean.

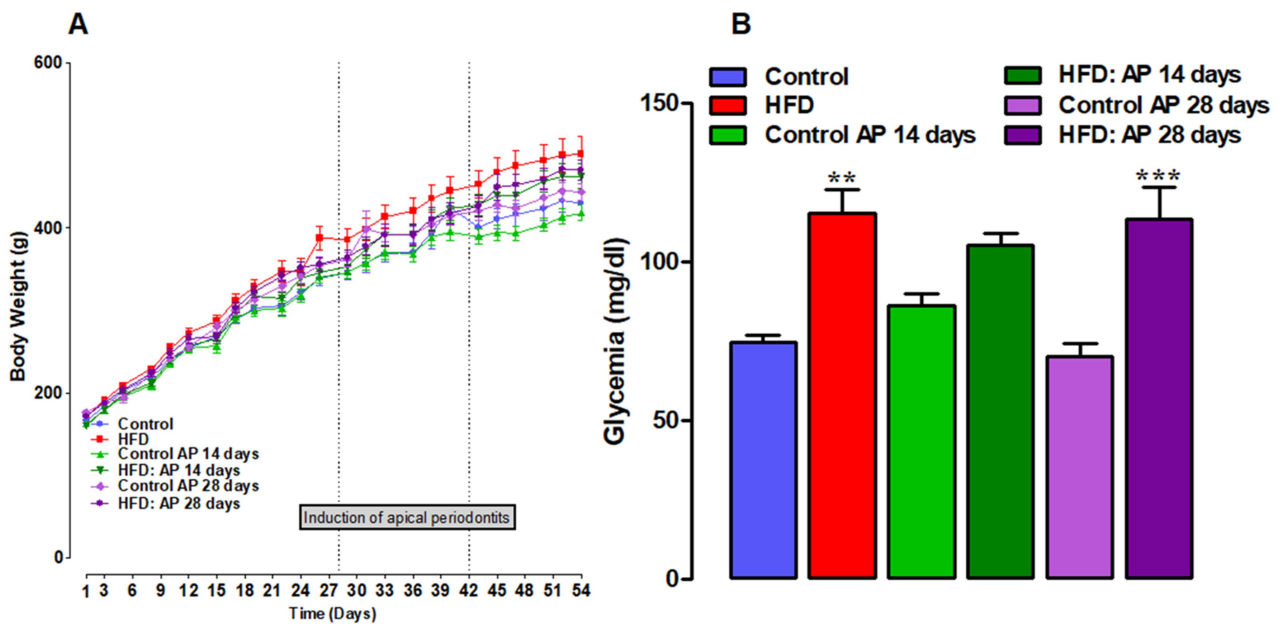


Figure 2. (A) Serum leptin levels in the HFD group are significantly increased in relation to control (**, $P < .01$). (B) Intestinal leptin levels in control AP 28 days and HFD AP 28 days groups are significantly increased in relation to control (*, $P < .05$) and between them (**, $P < .01$). (C) Serum adiponectin levels in the HFD group are significantly increased in relation to control (**, $P < .01$). (D) Intestinal adiponectin levels demonstrating no statistical differences among the groups. The columns represent the mean of 6–7 animals and the vertical lines indicate the standard error of mean ($P < .05$).

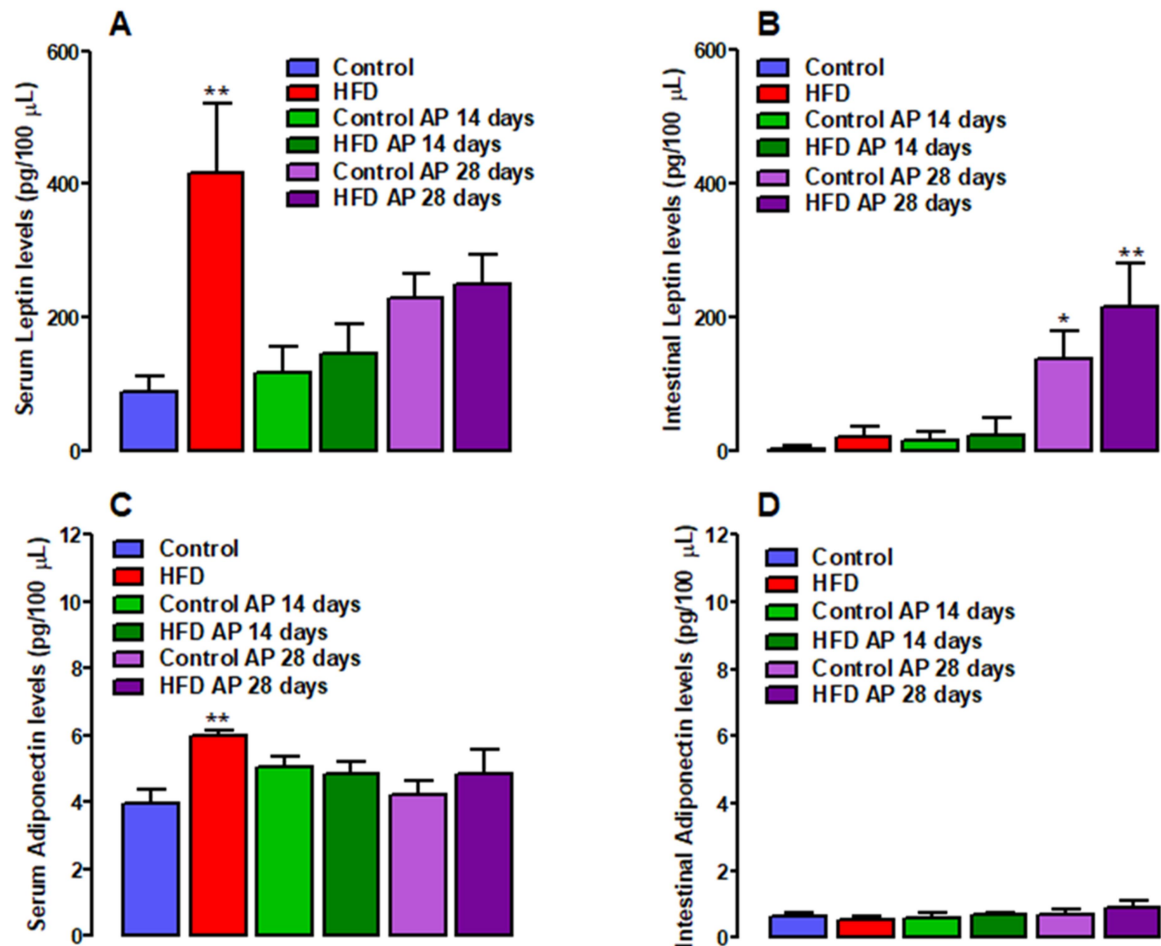


Figure 3. Representative images of histological analysis (H&E staining). (A) Control sample; the arrowhead shows the normal pulp tissue (100x). (B) HFD sample; the arrowhead shows normal periapical tissue with preserved periodontal ligament; no bone resorption is observed (200x). (C) Control AP 14 days sample showing coronal opening access (●), abscess inside the root (arrowhead), and mild inflammation at the periapical area (*) (40x). (D) HFD AP 14 days sample showing mild inflammation (*) at the periapical area without bone resorption (200x). (E) Control AP 28 days sample showing coronal opening access (●), totally necrotic pulp tissue, abscess at the periapical area (arrowhead), and extended inflammatory process with bone resorption (*) (40x). (F) HFD 28 days sample showing severe and extended inflammation (*) with abscess formation (arrows) (200x). (G) Data demonstrating the time-related inflammatory scores at the periapical area in groups AP 14 days and AP 28 days. Significantly different in relation to control (**, $P < .01$); significantly different when comparing AP 14 days and AP 28 days, irrespective of HFD (##, $P < .01$). The columns represent the mean of 7-10 experiments and the vertical lines indicate the standard error of mean.

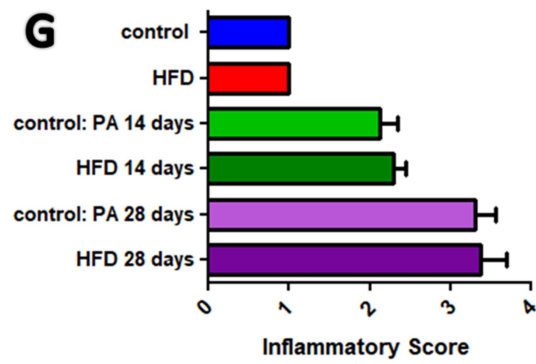
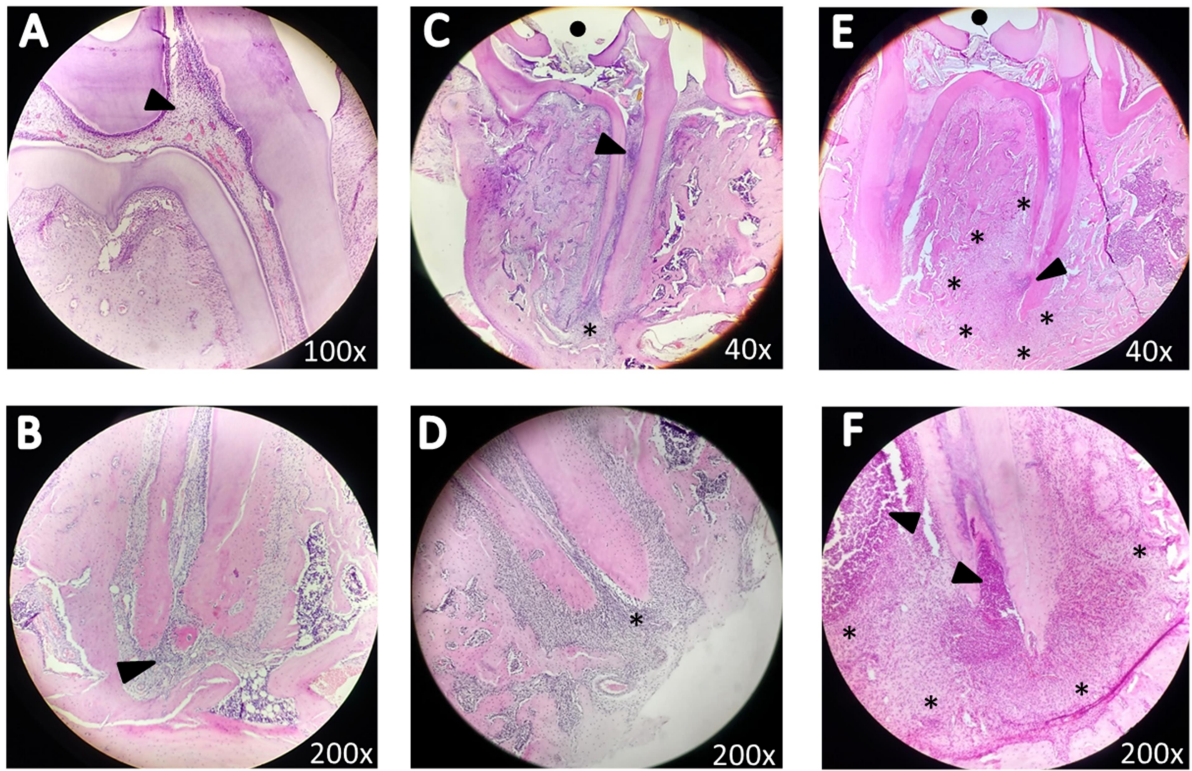
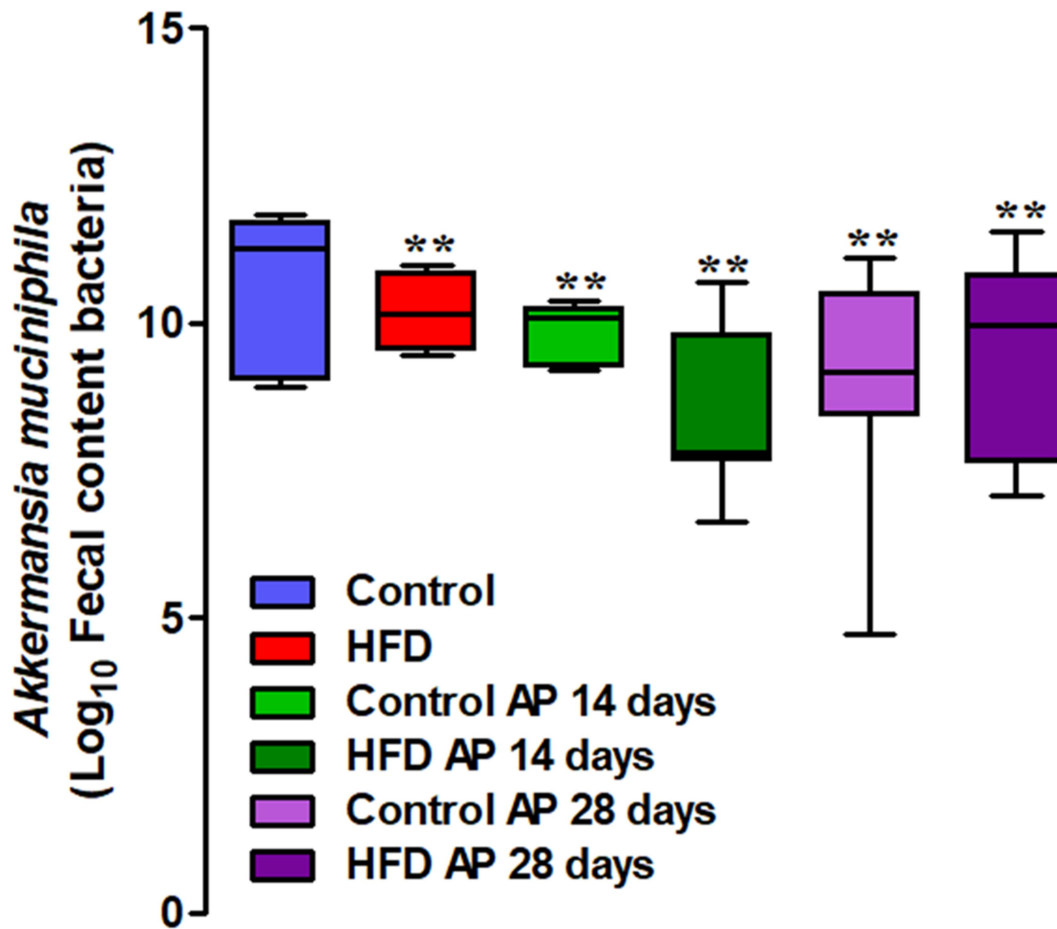
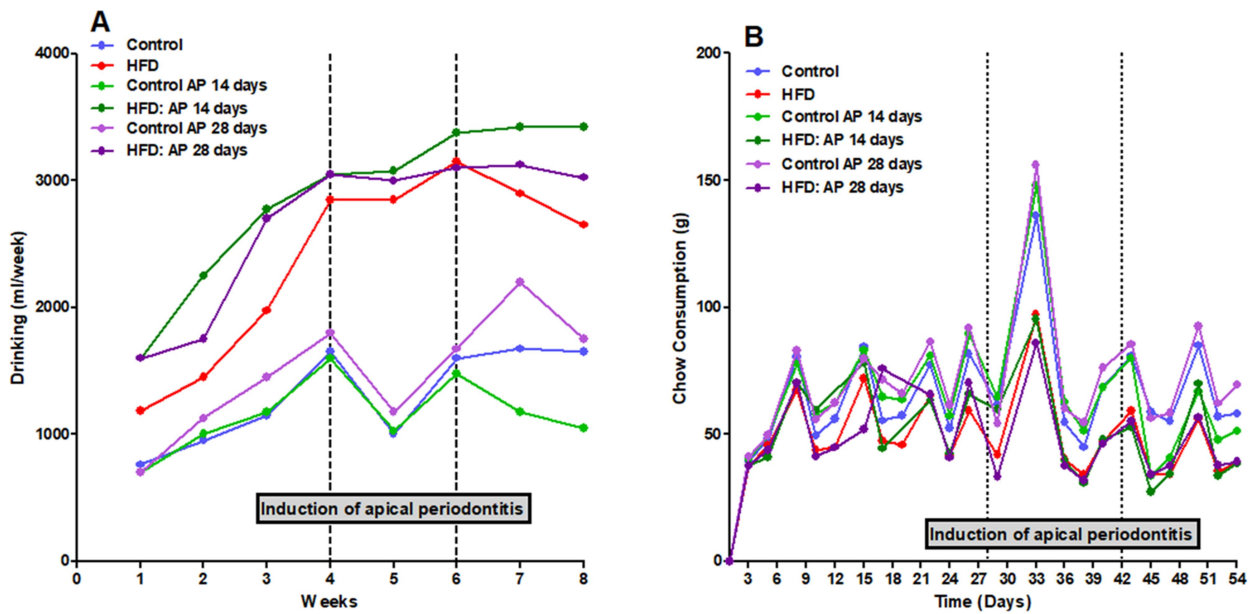


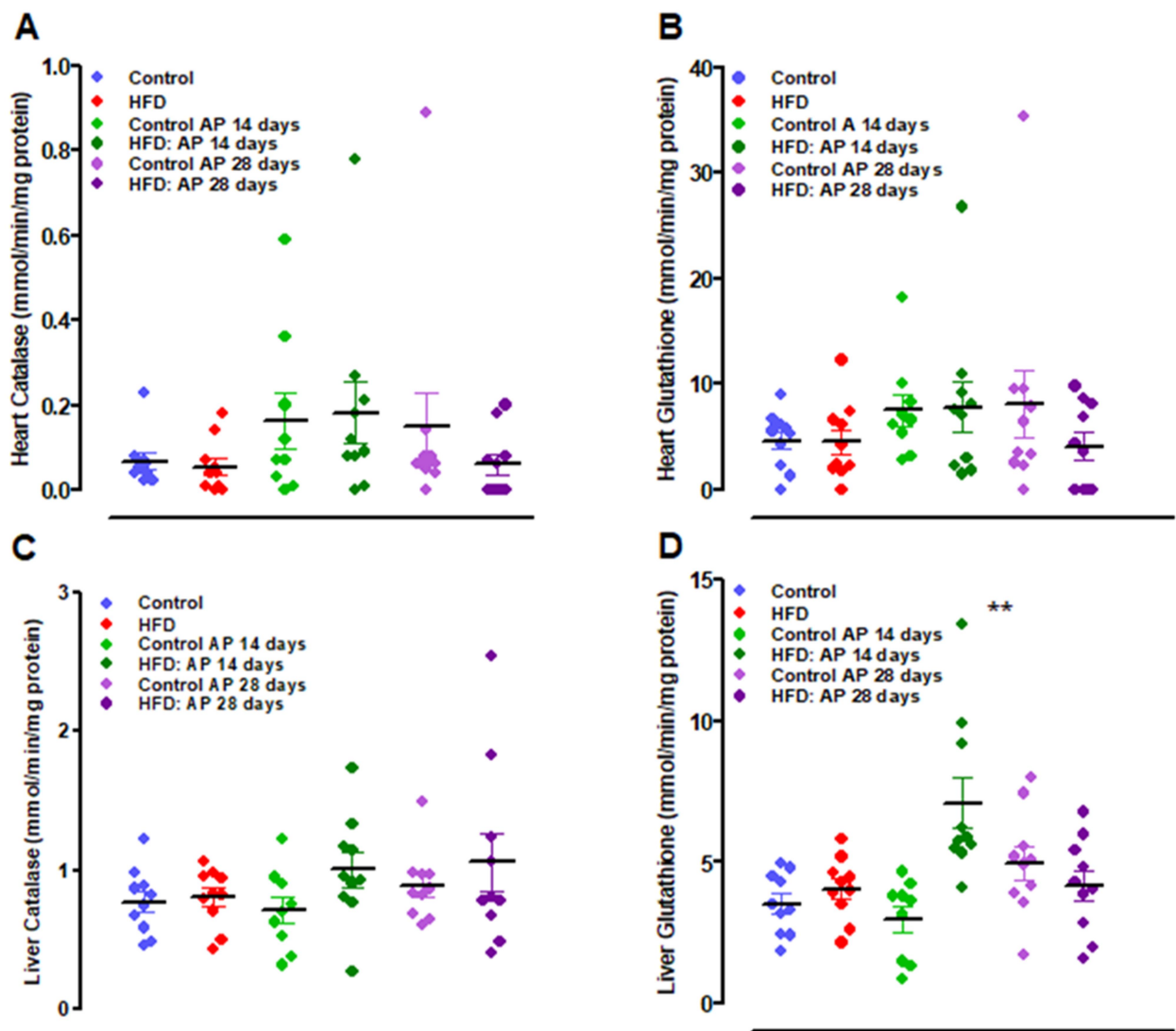
Figure 4. Fecal *Akkermansia muciniphila* expression is significantly reduced in all HFD and AP groups, in relation to control group (**, $P < .01$). The columns represent the mean of 5-10 experiments and the vertical lines indicate the standard error of mean.



Supplementary Figure 1. (A) Changes in water consumption throughout 8 weeks demonstrating increased water consumption since the beginning, especially from the 4th week on, in all HFD groups in relation to controls. (B) Changes in chow consumption throughout 8 weeks demonstrating a decrease in chow consumption in all HFD groups in relation to controls, especially from the 3rd week on. Dotted lines represent interventions to induce AP at 28 days and 14 days, respectively. Each point represents the mean of water and chow consumption in each cage, at different time-points.



Supplementary Figure 2. Catalase (A and C) and glutathione (B and D) activities in heart (A and B) and livers (C and D) as an indicative of oxidative stress. The liver glutathione levels were significantly increased in the group HFD AP 14 days, in relation to the control (**, $P < .01$). The columns represent the mean of 9-10 experiments and the vertical lines indicate the standard error of mean.



4.8. References

1. World Health Organization (WHO). Global Health Observatory (GHO) – Overweight. Access: 07/10/2017. http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_text/en/
2. Abdelaal M, le Roux CW, Docherty NG. Morbidity and mortality associated with obesity. *Ann Transl Med* 2017;5(7):161.
3. Bleich S, Cutler D, Murray C, et al. Why is the developed world obese? *Annu Rev Public Health*. 2008;29:273-95.
4. Xiao S, Zhao L. Gut microbiota-based translational biomarkers to prevent metabolic syndrome via nutritional modulation. *FEMS Microbiol Ecol*. 2014 Feb;87(2):303-14.
5. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*. 2013 Sep 6;341(6150):1241-1244.
6. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007 Jul;56(7):1761-72.
7. Tilg H, Kaser A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *J. Clin. Invest.* *J Clin Invest*. 2011 Jun;121(6):2126-32.
8. Delzenne NM, Neyrinck AM, Cani PD. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic properties: consequences for host health in the context of obesity and metabolic syndrome. *Microb Cell Fact*. 2011 Aug 30;10 Suppl 1:S10.
9. Cani PD. Gut microbiota – at the intersection of everything? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017 Jun;14(6):321-322.
10. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*. 2016 Feb;65(2):330-9.
11. Wen L, Duffy A. Factors influencing the gut microbiota, inflammation, and type 2 diabetes. *J Nutr*. 2017 Jul;147(7):1468S-1475S.
12. Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, et al. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004 Sep;54(Pt 5):1469-76.

13. Collado MC, Derrien M, Isolauri E, et al. Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. Appl Environ Microbiol. 2007 Dec;73(23):7767-70.
14. Schneeberger M, Everard A, Gómez-Valadés AG, et al. *Akkermansia Muciniphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. Sci Rep. 2015 Nov 13;5:16643.
15. Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. Proc Natl Acad Sci USA 2013;110:9066–71.
16. Cani P; De Vos WM. Next-generation beneficial microbes: The case of *akkermansia muciniphila*. Front Microbiol. 2017 Sep 22;8:1765.
17. Sasaki H, Hirai K, Martins CM, et al. Interrelationship between Periapical Lesion and Systemic Metabolic Disorders. Curr Pharm Des. 2016;22(15):2204-15.
18. Gomes MS, Blattner TC, Sant'Ana Filho M, et al. Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? A systematic review and meta-analysis. J Endod. 2013 Oct;39(10):1205-17.
19. Gurav A, Jadhav V. Periodontitis and risk of diabetes mellitus. Journal of Diabetes 2011; 3:21–28.
20. Pasqualini D, Bergandi L, Palumbo L, et al. Association among oral health, apical periodontitis, CD14 polymorphisms, and coronary heart disease in middle-aged adults. J Endod 2012;38:1570-1577.
21. Um YJ, Jung U, Kim C, et al. The influence of diabetes mellitus on periodontal tissues: a pilot study. J Periodontal Implant Sci 2010;40:49-55.
22. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, et al. Animal research: reporting in vivo experiments-the ARRIVE guidelines. J Cereb Blood Flow Metab. 2011 Apr;31(4):991-3.
23. Al-Rasheed N, Al-Rasheed N, Bassiouni Y, et al. Potential Protective Effects of *Nigella Sativa* and *Allium Sativum* Against Fructose-Induced Metabolic Syndrome in Rats. J Oleo Sci 63 (8) 839-848 (2014).
24. Wolle CFB, Zollmann LA, Etges A, et al. Effects of the antioxidant agent tempol on periapical lesions in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy. J Endod 2012; 30:191-195.

25. Scarparo RK, Dondoni L, Böetcher D, et al. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis - an experimental model in rat molars. *J Endod* 2011; 37:1069-1073.
26. Stashenko P, Wang CY, Tani-Ishii N, et al. Pathogenesis of induced periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78:494-502.
27. Figueiredo JAP, Pesce HE, Gioso MA, et al. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. *Int Endod J*. 2001 Jul;34(5):377-85.
28. Shawkya NM, Shehatoua GSG, Rahimb MA, et al. Levocetirizine ameliorates high fructose diet-induced insulin resistance, vascular dysfunction and hepatic steatosis in rats. *Eur J Pharmacol*. 2014 Oct 5;740:353-63.
29. Saad AF, Dickerson J, Kechichian TB, et al. High-fructose diet in pregnancy leads to fetal programming of hypertension, insulin resistance, and obesity in adult offspring. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Sep;215(3):378.e1-6.
30. Rayssiguier Y, Gueux E, Nowacki W, et al. High fructose consumption combined with low dietary magnesium intake may increase the incidence of the metabolic syndrome by inducing inflammation. *Mgnes Res* 19(4), 237-43 (2006).
31. Maithilikarpagaselvi N, Sridhar MG, Swaminathan RP, et al. Curcumin prevents inflammatory response, oxidative stress and insulin resistance in high fructose fed male wistar rats: potential role of serine kinases. *Chem Biol Interact*. 2016 Jan 25;244:187-94.
32. Vazquez-Prieto MA, González RE, Renna NF, et al. Aqueous garlic extracts prevent oxidative stress and vascular remodeling in an experimental model of metabolic syndrome. *J Agric Food Chem*. 2010 Jun 9;58(11):6630-5.
33. Galipeau D, Verma S, McNeill JH. Female rats are protected against fructose-induced changes in metabolism and blood pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Dec;283(6):H2478-84.
34. Pontes Andersen CC, Flyvbjerg A, Buschard K, Holmstrup P. Periodontitis is associated with aggravation of prediabetes in Zucker fatty rats. *J Periodontol*. 2007 Mar;78(3):559-65.

35. Watanabe K, Petro BJ, Shlimon AE, et al. Effect of periodontitis on insulin resistance and the onset of type 2 diabetes mellitus in Zucker diabetic fatty rats. *J Periodontol.* 2008 Jul;79(7):1208-16.
36. Sell H, Habich C, Eckel J. Adaptive immunity in obesity and insulin resistance *Nat Rev Endocrinol.* 2012 Dec;8(12):709-16.
37. Vielma SA, Klein RL, Levingston CA, et al. Adipocytes as immune-regulatory cells. *Int Immunopharmacol.* 2013 Jun;16(2):224-31.
38. Yoo S, Ahn H, Park YK. High dietary fructose intake on cardiovascular disease related parameters in growing rats. *Nutrients.* 2016 Dec 26;9(1).
39. Matsushita K, Tajima T, Tomita K, et al. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses against possible causative bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. *J Endod.* 1998 Dec;24(12):817-21.
40. Lozano I, Van der Werf R, Bietiger W, et al. High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutr Metab (Lond).* 2016 Feb 25;13:15.
41. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 2004 Jan;25(1):4-7.
42. Castrogiovanni D¹, Alzamendi A, Ongaro L, et al. Fructose rich diet-induced high plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) production in the adult female rat: protective effect of progesterone. *Nutrients.* 2012 Aug;4(8):1137-50.
43. Luo S, Yang X, Wang D, et al. Periodontitis contributes to aberrant metabolism in type 2 diabetes mellitus rats by stimulating the expression of adipokines. *J Periodontal Res.* 2016 Aug;51(4):453-61.
44. Glban AM, Vasiljević A, Veličković N, Nikolić-Kokić A, Blagojević D, Matić G, Nestorov J. The expression and activity of antioxidant enzymes in the liver of rats exposed to high-fructose diet in the period from weaning to adulthood. *J Sci Food Agric.* 2015 Aug 30;95(11):2319-24.
45. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;20:340-9.

46. Ego-Osuala DC, Negrón L, Gordon S, et al. The evaluation of systemic inflammation in patients with localized versus spreading endodontic infections. *J Endod* 2012; 38:e42.
47. L. Geurts, A.M. Neyrinck, N.M. Delzenne, et al. Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Beneficial Microbes*, March 2014; 5(1): 3-17.
48. Barczynska R, Slizewska K, Litwin M, et al. Effects of dietary fiber preparations made from maize starch on the growth and activity of selected bacteria from the Firmicutes, Bacteroidetes, and Actinobacteria phyla in fecal samples from obese children. *Acta Biochim Pol.* 2016;63(2):261-6.
49. Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, et al. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:1469–76.
50. Karlsson CL, Onnerfalt J, Xu J, et al. The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obesity (Silver Spring)* 2012;20:2257–61.
51. Gomes C, Martinho FC, Barbosa DS, et al. Increased Root Canal Endotoxin Levels are Associated with Chronic Apical Periodontitis, Increased Oxidative and Nitrosative Stress, Major Depression, Severity of Depression, and a Lowered Quality of Life. *Mol Neurobiol.* 2017 Apr 28.
52. Willershausen B, Kasaj A, Willershausen I, et al. Association between chronic dental infection and acute myocardial infarction. *J Endod* 2009;35:626-30.
53. Frisk F, Hakerberg M, Ahlqwist M, et al. Endodontic variables and coronary heart disease. *Acta Odontol Scand* 2003; 61:257-62.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo desenvolvido durante o curso de doutorado, de uma maneira geral, traz consigo a responsabilidade de investigar a pergunta científica com base nas evidências prévias da literatura. A escolha do tema desta tese partiu primeiramente de uma idéia filosófica do pensamento complexo (tema desenvolvido por Edgar Morin). Esta ideia se equilibra entre o pensamento linear (reducionista) e o “holístico” (sistêmico). No pensamento reducionista clássico, existe uma divisão do todo para o estudo em partes separadas. Já o “holismo”, estuda o todo. Ambos podem levar à alienação por não haver uma ponderação e serem análises muito restritas. Sendo assim, o pensamento complexo busca ler esta interface transacional que complementa os olhares reducionistas e sistêmicos; preza pela comunicação como parte da construção; incorpora a dúvida como parte da vida; e traz o aprimoramento e a mudança como bases da estruturação do conhecimento. "Não é dissolver o ser, a existência e a vida no sistema, mas compreender o ser, a existência e a vida com a ajuda também do sistema" (Morin, 1977).

Com base nessa premissa, a escolha do tema partiu do sistêmico: dados da Organização Mundial de Saúde com índices alarmantes sobre o aumento exponencial da Obesidade e do Diabetes tipo II (quase 3 milhões de pessoas mortas ao ano por motivos de sobrepeso e obesidade? Que choque! - Dados já detalhados anteriormente na introdução desta tese). Juntamente com essas doenças crônicas, surge a vontade de verificar a influência da periodontite apical, uma doença inflamatória também crônica, endodôntica local, quase reducionista. “Quase”, porque ainda nos dia de hoje a

comunidade científica ainda tem muito a investigar sobre o seu papel nas repercussões sistêmicas. Haja vistos os resultados deste trabalho.

Avaliar obesidade, diabetes tipo2 e periodontite apical já nos empolgou de início. Todas estas estão envolvidas com o tema apaixonante da inflamação e já trariam uma gama complexa de informações e resultados. Porém, um tempo depois, surge a ideia de colocar bactérias do trato gastrintestinal no estudo. Lembro bem da professora Maria Martha chegando com um sorriso no rosto e dizendo pra mim: “-Cauana! Voltei de um congresso. As bactérias do intestino estão em alta!”. Sem pensar duas vezes, olhamos a literatura e notamos que cada vez mais surgiam artigos com a correlação entre doenças metabólicas e o tal “novo órgão”. Esta seria *a cereja do nosso bolo*. Na literatura, a nossa escolhida, a *Akkermansia muciniphila*, se mostrava presente em condições de saúde e não era nada compatível com gordura corporal e desordens inflamatórias. Uma bactéria do filo *Verrucomicrobia* com o papel de heroína do equilíbrio metabólico. Excelente! Ela pareceu um bom parâmetro a ser estudado e de fato foi. O resultado demonstra claramente a participação da PA e da desordem metabólica na diminuição dos seus níveis fecais, fenômeno que não acontece com o grupo controle. Em trabalhos futuros, ainda poderíamos verificar outras bactérias, tais como as gram-negativas *Escherichia*, a *Enterobacteria*, e a *H. Pylori* (etiologias de doenças intestinais), a fim de avaliar como é o comportamento delas associadas com a obesidade quando se tem a PA instalada.

Mas e o modelo? Bem, uma coisa era certa: seria muito difícil pontuar as alterações com um estudo clínico pelas dificuldades de padronização, tais como: idade,

hábitos alimentares, interações medicamentosas e associação com outras enfermidades. Sendo assim, o estudo em ratos *wistar* possibilitou um maior controle, com análise mais específica e um menor número de variáveis. Nos modelos animais, a interação das periapicopatias com o organismo pôde ser mais bem estudada. Pode-se dizer que se torna mais fiel a análise isolada quando se combinam técnicas histológicas, bioquímicas e moleculares, como realizado neste estudo. Dessa forma, este é um primeiro passo para a extrapolação de estudos maiores e com envolvimento clínico.

A dieta ocidental está cada vez mais rica em gorduras e açúcares, substâncias que têm sido fortemente associadas ao desenvolvimento de síndromes metabólicas. A frutose 10% utilizada neste estudo demonstrou-se um modelo muito interessante para a indução de diabetes tipo 2 relacionado a obesidade. Dentro deste contexto, a dieta ainda correlaciona-se fortemente com as bactérias do trato gastrintestinal as quais, dependendo da ingesta, mantém a função de estase ou instala a disbiose. A correlação inflamatória sistêmica que leva ao desenvolvimento de síndromes metabólicas parte de toxinas, tais como o lipopolissacarídeo, liberadas por bactérias que entram na corrente sanguínea e provocam a endotoxemia. Futuros trabalhos poderiam utilizar este modelo de HFD em ratos com um tempo maior de indução de frutose 10% e também maior tempo de indução de lesão periapical, a fim de verificar o curioso processo de cura das lesões periapicais e a sua repercussão sistêmica. Sendo assim, do ponto de vista odontológico torna-se superinteressante a novidade que o presente estudo traz para a área da saúde, de que a periodontite apical afeta níveis sistêmicos de adipocinas e altera a flora gastrintestinal,

provocando disbiose. Mais uma peça para o quebra-cabeças da complexa síndrome metabólica.

De uma maneira geral, com o constante crescimento da obesidade e do diabetes tipo 2 no mundo todo, a comunidade científica ainda necessita conhecer melhor as atividades moleculares sistêmicas envolvendo as síndromes metabólicas e esta correlação entre PA e bactérias intestinais. Os esforços também devem incluir o direcionamento clínico da não instalação dessas comorbidades a fim de diminuir custos de saúde pública com planos de tratamento mais completos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

1. World Health Organization (WHO). Framework for the implementation of the Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health in the Eastern Mediterranean Region. 2010.
2. Gilbert, CA; Slingerland, JM. Cytokines, Obesity, and Cancer: New Insights on Mechanisms Linking Obesity to Cancer Risk and Progression. *Annu Rev Med* 2013. 64:45–57.
3. Bistrian B. Systemic response to inflammation. *Nutr Rev* 2007; 65(12 Pt 2): S170–S172.
4. World Health Statistics (WHS). Part III. Global Health Indicators. 2013.
5. World Health Organization (WHO). Global Health Observatory (GHO) – Overweight. Acesso em: 05/11/2017. http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_text/en/index.html
6. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Acesso em: 05/11/17. <http://www.abeso.org.br/noticia/quase-60-dos-brasileiros-estao-acima-do-peso-revela-pesquisa-do-ibge>
7. World Health Organization (WHO). Childhood overweight and obesity. Acesso em: 05/11/17. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/en/>
8. The World Health Organization (WHO) Forum and Technical Meeting on Population-based Prevention Strategies for Childhood Obesity. Geneva, Switzerland, 15 to 17 December 2009.
9. *International Diabetes Federation (IDF)*. Annual-report, 2011.
10. Global Reports on Diabetes – World Health Organization 2016. Printed in France.
11. Screening for Type 2 Diabetes - Report of a World Health Organization and International Diabetes Federation meeting, 2003.
12. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDF Consultation. 2006.
13. Marchetti E, Monaco A, Procaccini L, Stefano M, Gatto R, Tetè S, et al. Periodontal disease: the influence of metabolic syndrome. *Nutrition & Metabolism* 2012, 9:88.
14. American Heart Association. About Metabolic Syndrome. Acesso em: 05/11/2017. http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/More/MetabolicSyndrome/About-Metabolic-Syndrome_UCM_301920_Article.jsp

15. Karelis AD, Rabasa-Lhoret R. Inclusion of C-reactive protein in the identification of metabolically healthy but obese (MHO) individuals. *Diabetes Metab* 2008;34: 183-184.
16. Karelis AD. Metabolically healthy but obese individuals. *Lancet* 2008;372: 1281-1283.
17. Phillips CM, Dillon C, Harrington JM, McCarthy VJ, Kearney PM, Fitzgerald AP, et al. Defining metabolically healthy obesity: role of dietary and lifestyle factors. *PLoS One*. 2013 Oct 17;8(10):e76188.
18. Leite LD, Rocha EDM, Brandão-Neto J. Obesity: an inflammatory disease. *Revista Ciência & Saúde* , Porto Alegre, v. 2, n. 2, p. 85-95, jul./dez. 2010.
19. Ruskovska T, Bernlohr DA., Oxidative stress and protein carbonylation in adipose tissue— Implications for insulin resistance and diabetes mellitus, *J Prot* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.04.002>
20. Faintuch J, Horie LM, Barbeiro HV, Barbeiro DF, Soriano FG, Ishida RK, Cecconello I. Systemic inflammation in morbidly obese subjects: response to oral supplementation with alpha-linolenic acid. *Obes Surg* 2007; 17: 341–347.
21. Kaput J, Ordovas JM, Ferguson L, van Ommen B, Rodriguez RL, Allen L, et al. The case for strategic international alliances to harness nutritional genomics for public and personal health. *Br J Nutr*. 2005;94:623-32.
22. Erdman SE, Poutahidis T. Role for inflammation and regulatory T-cells in colon cancer. *Toxicol Pathol* 2010; 38:76-87.
23. Junqueira LC; Carneiro J. *Histologia Básica*. 11ª ed; Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 2008. 556p.
24. Meijer K, de Vries M, Al-Lahham S, Bruinenberg M, Veening D, Dijkstra M et al. Human primary adipocytes exhibit immune cell function: adipocytes prime inflammation independent of macrophages. *PLoS One* 2011; 6:e17154.
25. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 911–919.
26. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006; (444) 7121:840-6.
27. Abbas AK; Lichtman AH; Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7ª ed; Rio de Janeiro: Ed. Elsevier; 2011. 592p.

28. Shin JY, Kim SY, Jeung MJ, Eun SH, Woo CW, Yoon SY, Serum Lee KH. Adiponectin, C-reactive protein and TNF-alpha levels in obese Korean children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2008; 21: 23–29.
29. Kopp HP, Kopp CW, Festa A, Krzyzanowska K, Kriwanek S, Minar E, Roka R, Schernthaner G. Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1042–1047.
30. Cheng SP, Liu CL, Hsu YC, Chang YC, Huang SY, Lee JJ. Expression and biologic significance of adiponectin receptors in papillary thyroid carcinoma. *Cell Biochem Biophys*, 2013 Mar;65(2):203-10.
31. Li H, Edin ML, Bradbury JA, Graves JP, et al. COX-2 Inhibits Th9 Differentiation During Allergic Lung Inflammation Via Downregulation of IL-17RB. *Am J Respir Crit Care Med* 2013.
32. Nishimura F, Murayama Y: Periodontal inflammation and insulin resistance, lessons from obesity. *J Dent Res* 2001, 80(suppl.8):1690-1694.
33. Bullon P, Morillo JM, Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL, Newman HN, Battino M: Metabolic Syndrome and Periodontitis: Is oxidative stress a common link? *J Dent Res* 2009, 88:503-518.
34. El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaeck C, Flier JS: Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet induced obesity. *J Clin Invest* 2000, 105: 1827-1832.
35. Mattioli B., E. Straface, M. G. Quaranta, L. Giordani, and M. Viora. 2005. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. *J. Immunol.* 174: 6820–6828.
36. Vielma SA, Klein RL, Levingston CA, Young MRI. Adipocytes as immune regulatory cells. *Int Immunopharmacol* 16 (2013) 224-231.
37. Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M, et al. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 2000;164:3471–5.
38. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:3015–25.
39. Reyna SM, Ghosh S, Tantiwong P, Meka CS, Eagan P, Jenkinson CP, et al. Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects. *Diabetes* 2008;57:2595–602.

40. Ladefoged M, Buschard K, Hansen AMK. Increased expression of toll-like receptor 4 and inflammatory cytokines, interleukin-6 in particular, in islets from a mouse model of obesity and type 2 diabetes. *APMIS* (2012) 121: 531–538.
41. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665–8.
42. Palsson-McDermott EM, O’Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, toll-like receptor-4. *Immunology* 2004;113:153–62.
43. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, et al. Loss-of-function mutation in toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1986–98.
44. Lamb RE, Goldstein BJ. Modulating oxidative-inflammatory cascade: potential new treatment strategy for improving glucose metabolism, insulin resistance, and vascular function. *Int J Clin Pract* 2008;62:1087-95.
45. Karaouzene N, Merzouk H, Aribi M, Merzouk SA, Berrouguet AY, Tessier C, et al. Effects of the association of aging and obesity on lipids, lipoproteins and oxidative stress biomarkers: A comparison of older with young men. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease* (2011) 21, 792-799.
46. Uzun H, Zengin K, Taskin M, Aidin S, Simsek G, Dariyerli N. Changes in leptin, plasminogen activator factor and oxidative stress in morbidly obese patients following open and laparoscopic Swedish adjustable gastric banding. *Obes Surg* 2004; 14: 659– 665.
47. De groote D, Van Belleghem K, Devière J, Van Brussel W, Mukaneza A, Amininejad L. Effect of the intake of resveratrol, resveratrol phosphate, and catechin rich grape seed extract on makers of oxidative stress and gene expression in adult obese subjects. *Ann Nutr Metab* 2012;61:15-24.
48. Bogdanski P, Suliburska J, Szulinska M, Stepien M, Pupek-Musialik D, Jabeckla A. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. *Nutr Res.* 2012;32:421-7.
49. Gutierrez-Lopes L, Garcia-Sanchez JR, Rincon-Viques Mde J, Lara-Padilla E, Sierra-Vargas MP, Olivares-Corichi IM. Hypocaloric diet and regular moderate aerobic exercise is an effective strategy to reduce anthropometric parameters and oxidative stress in obese patients. *Obese Facts.* 2012;5:12-22.

50. Tabak O, Gelisgen R, Erman H, Erdenen F, Muderrisoglu C, Aral H, et al. Oxidative, lipid, protein and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of diabetes mellitus. *Clin Invest Med* 2011;34:E163-71.
51. Gradinaru D, Borsa C, Ionescu C, Margina D. Advanced oxidative and glycoxidative protein damage markers in elderly with type 2 diabetes. *J Prot* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.03.034>.
52. Prasad A, Bekker P, Tsimikas S. Advanced glycation end products and diabetic cardiovascular disease. *Cardiol Rev* 2012; 20:177-83.
53. Chaissang B, Gewirtz AT. Gut Microbiota, Low-grade Inflammation and Metabolic Syndrome. *Toxicologic Pathology* 2014; 42: 49-53.
54. Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* 2002; 22: 283-307.
55. Hostamisliligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444: 860-67.
56. Xiao S, Zhao L. Gut microbiota-based translational biomarkers to prevent metabolic syndrome via nutritional modulation. *FEMS Microbiol Ecol* 2014; 87:303–314.
57. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 2013; 6;341(6150):1241214.
58. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 2013;500:541–6.
59. Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, et al. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:121–31.
60. Robertson MD, Currie JM, Morgan LM, et al. Prior short-term consumption of resistant starch enhances postprandial insulin sensitivity in healthy subjects. *Diabetologia* 2003;46:659–65. 41
61. Robertson MD, Bickerton AS, Dennis AL, et al. Insulin-sensitizing effects of dietary resistant starch and effects on skeletal muscle and adipose tissue metabolism. *Am J Clin Nutr* 2005;82:559–67.
62. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* 2014;156:84–96.
63. Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, et al. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004;54:1469–76.

64. ref art email
65. Everard A, Lazarevic V, Derrien M, et al. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes* 2011;60:2775–86
66. Santacruz A, Collado MC, Garcia-Valdes L, et al. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *Br J Nutr* 2010;104:83–92.
67. Karlsson CL, Onnerfalt J, Xu J, et al. The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight. *Obesity (Silver Spring)* 2012;20:2257–61.
68. Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:9066–71.
69. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 2013; 341(6150):1241214.
70. Xiao S, Zhao L. Gut microbiota-based translational biomarkers to prevent metabolic syndrome via nutritional modulation. *FEMS Microbiol Ecol* 2014; 87:303–314.
71. An HM, Park SY, Lee DK, Kim JR, Cha MK, Lee SW, Lim HT, Kim KJ, Ha NJ. Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium* spp. in high fat diet-induced obese rats. *Lipids Health Dis* 2011; 10: 116.
72. Chen JJ, Wang R, Li X-F & Wang R-L. *Bifidobacterium longum* supplementation improved high-fat-fed-induced metabolic syndrome and promoted intestinal Reg I gene expression. *Exp Biol Med* 2011; 236: 823–831.
73. Fäk F, Bäckhed F. *Lactobacillus reuteri* prevents diet-induced obesity, but not atherosclerosis, in a strain dependent fashion in *Apoe*/mice. *PLoS One* 2012; 7: e46837.
74. Cani PD, Amar J, Iglesias MA et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56: 1761–1772.
75. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20(3):340-49.
76. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9:498-521.

77. Ferrari PHP, Bombana AC. A infecção endodôntica e a sua resolução. São Paulo: Ed. Santos; 2010. 358p.
78. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, et al. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res* 2007;86:303-19.
79. Gomes MS, Blattner TC, Sant'Ana Filho M, Grecca FS, Hugo FN, Fouad AF, Reynolds MA. Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? A systematic review and meta-analysis. *J Endod* 2013; 39(10):1205-1217.
80. Doxey DH, Cutler CW, Iacopino AM. Diabetes Prevents Periodontitis-Induced Increases in Gingival Platelet Derived Growth Factor-B and Interleukin 1-Beta in a Rat Model. *J Periodontol* 1998; 69:113-119.
81. Grossi SG. Treatment of periodontal disease and control of diabetes: an assessment of the evidence and need for future research. *Ann Periodontol* 2001; 6(1):138-145.
82. Kuramitsu HK, Qi M, Kang I, Chen W. Role for periodontal bacteria in cardiovascular Disease. *Ann Periodontol* 2001; 6:41-47.
83. Gurav A, Jadhav V. Periodontitis and risk of diabetes mellitus. *Journal of Diabetes* 2011; 3:21–28.
84. Matilla K, Vesanen M, Valtonen V, Nieminen M, Palosuo T, Rasi V, et al. Effect of treating periodontitis on C-reactive protein levels: a pilot study. *BMC Infectious Disease* 2002;2:30.
85. Pasqualini D, Bergandi L, Palumbo L, Borraccino A, Dambra V, Alovisi M, et al. Association among oral health, apical periodontitis, CD14 polymorphisms, and coronary heart disease in middle-aged adults. *J Endod* 2012;38:1570-1577.
86. Um YJ, Jung U, Kim C, Bak E, Cha J, Yoo Y, et al. The influence of diabetes mellitus on periodontal tissues: a pilot study. *J Periodontal Implant Sci* 2010;40:49-55.
87. Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. 11a ed. *Periodontia Clínica*. São Paulo: Ed Elsevier. 1208p.
88. Löe H. Periodontal disease: The sixth complication of diabetes mellitus. *Diab Care* 1993;16:329-334.
89. Emrich L, Shlossman M, Genco R. Periodontal disease in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1991;62:123-130.
90. Sastrowijoto SH, van der Veiden U, van Steenberghe TJ, et al. Improved metabolic control, clinical periodontal status and subgingival microbiology in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 1990;17:233-242.

91. Zambon JJ, Reynolds H, Fisher JG, Shlossman M, Dunford R, Genco RJ. Microbiological and immunological studies of adult periodontitis in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Periodontol*. 1988; 59: 23–31.
92. Manoucher PM, Spagnuolo PJ, Rodman HM, Bissada NF. Comparison of neutrophil chemotactic response in diabetic patients with mild and severe periodontal disease. *J Periodontol*. 1981; 52: 410–5.
93. Preschaw PM, Alba AL, Herrera AD, et al. Periodontitis and diabetes: a two way relationship. *Diabetologia* 2012;55:21-31.
94. Monnier VM, Glomb M, Elgawish A, Sell DR. The mechanism of collagen cross linking in diabetes. A puzzle nearing resolution. *Diabetes*. 1996; 45: 67–72.
95. Di Paola R, Briguglio F, Paterniti I, Mazzon E, Oteri G, Militi D, Cordasco G, Cuzzocrea S. emerging role of PPAR- β/δ in inflammatory process associated to experimental periodontitis. *Mediators Inflamm* 2011; 7:87-159.
96. Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2007; 44: 127–53.
97. Rodrigues DC, Tabe MJ, Novaes AB, Souza SL, Grisi MF. Effect of non-surgical periodontal therapy on gly- cemic control in patients with Type 2 diabetes mellitus. *J Periodontol*. 2003; 74: 1361–7.
98. Schmidt AM, Hori O, Cao R et al. RAGE: A novel cellular receptor for advanced glycation end products. *Diabetes*. 1996; 45: 77–80.
99. D’Aiuto F, Parkar M, Andreou G, et al. periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. *J Dent Res* 2004; 83:156-160.
100. López NJ, Quintero A, Casanova PA, Ibieta CI, Baelum V, López R. Effects of periodontal therapy on systemic markers of inflammation in patients with metabolic syndrome: a controlled clinical trial. *J Periodontol* 2012; 83(3):267-278.
101. Astolpho RD, Curbete MM, Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, Prieto AKC, et al. Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. *J Endod* 2013; 39:648-652.
102. Wolle CFB, Zollmann LA, 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; 30:191-195.

103. Martinho FC, Chiesa WMM, Leite, FRM, Cirelli JA, Gomes BPFA. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1 β and tumor necrosis factor α . *J Endod* 2010;36:1467-1474.
104. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008; 57:1470–81.
105. Marotta PS, Fontes TV, Armada L, Lima KC, Rôças IN, Siqueira Jr JF. Type 2 diabetes mellitus and the prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment in adult Brazilian population. *J Endod* 2012; 38:297-300.

ANEXO 1 – Carta de Aprovação Comissão Científica da Faculdade de Odontologia e código SIPESQ



SIPESQ
Sistema de Pesquisas da PUCRS



Código SIPESQ: 6050

Porto Alegre, 26 de novembro de 2014.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Relação entre periodontite apical, microbiota intestinal e alterações metabólicas em ratos: determinação de biomarcadores." coordenado por MARIA MARTHA CAMPOS. Caso este projeto necessite apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP/CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ANEXO 2 – Carta de Aprovação Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



Porto Alegre, 11 de 11 de 20 14.

Prezados Senhores,

Eu, Maurício Reis Bogo (Coordenador da Comissão Científica do Instituto de Toxicologia e Farmacologia) da PUCRS, conheço o protocolo de pesquisa intitulado **"Relação entre periodontite apical, microbiota intestinal e alterações metabólicas em ratos: determinação de biomarcadores."** desenvolvida por Maria Martha Campos.

O início desta pesquisa só poderá ocorrer a partir da apresentação da carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS.

Atenciosamente,

Assinatura do Coordenador/Chefe de Serviço

Porto Alegre, 11 de 11 de 20 14.

Prezados Senhores,

Eu, Fabio Luiz Dal Moro Malto (Coordenador do Laboratório de Patologia) da PUCRS, conheço o protocolo de pesquisa intitulado **"Relação entre periodontite apical, microbiota intestinal e alterações metabólicas em ratos: determinação de biomarcadores."** desenvolvida por Maria Martha Campos.

O início desta pesquisa só poderá ocorrer a partir da apresentação da carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS.

Atenciosamente,

Assinatura do Coordenador/Chefe de Serviço

FABIO LUZ DAL MORO MALTO
COORDENADOR

ANEXO 3 – Termo de Responsabilidade CEUA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

TERMO DE RESPONSABILIDADE(LEIA CUIDADOSAMENTE ANTES DE ASSINAR)

Eu, Maria Martha Campos, certifico que:

- a) li o disposto na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e nas demais normas aplicáveis à utilização de animais em ensino e/ou pesquisa, especialmente as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA;
- b) estou ciente da exigência legal de fiscalização e colaborarei com a mesma;
- c) conheço o Regulamento da CEUA-PUCRS;
- d) este estudo não é desnecessariamente duplicativo, possuindo mérito científico e a equipe participante deste projeto/aula foi treinada e é competente para executar os procedimentos descritos neste protocolo;
- e) não existe método substitutivo que possa ser utilizado como uma alternativa.

Nome por extenso e assinatura do responsável pelo projeto/aula: *Maria Martha Campos*

Nome por extenso e assinatura do Veterinário Responsável acompanhado de carimbo indicando o número do CRM/CFMV (quando cabível):

Nome por extenso e assinatura do Diretor da Unidade:

Prof. Angélica Maria Cecile Fritscher
Vice-Diretora
Fac. de Odontologia PUCRS
CRO-RS 5107

Data: *11/11/2014*PARA USO EXCLUSIVO DA COMISSÃO
RESOLUÇÃO DA COMISSÃO

AVALIAÇÃO GERAL DO PROJETO

- Aprovado
- Pendente
- Não aprovado

Questões levantadas pela CEUA – PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br