

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL: DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA**

**INFLUÊNCIA DE DESORDENS METABÓLICAS NO DESENVOLVIMENTO
DE LESÕES PERIAPICAIS EM RATOS: EFEITO DA TERAPIA
ANTIOXIDANTE**

CARLOS FREDERICO BRILHANTE WOLLE

PORTO ALEGRE

2012

CARLOS FREDERICO BRILHANTE WOLLE

**INFLUÊNCIA DE DESORDENS METABÓLICAS NO DESENVOLVIMENTO
DE LESÕES PERIAPICAIS EM RATOS: EFEITO DA TERAPIA
ANTIOXIDANTE**

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.

ORIENTADOR: Prof.^a Dra. MARIA MARTHA CAMPOS

**PORTO ALEGRE
2012**

CARLOS FREDERICO BRILHANTE WOLLE

**INFLUÊNCIA DE DESORDENS METABÓLICAS NO DESENVOLVIMENTO
DE LESÕES PERIAPICAIS EM RATOS: EFEITO DA TERAPIA
ANTIOXIDANTE**

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.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a Dr^a Patrícia Maria Poli Kopper Móra

Prof^a Dr^a Roberta Kochenborger Scarparo

Prof Dr Francisco Montagner

Prof Dr Carlos Alexandre Souza Bier

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Ivone (in memoriam) e Carlos Alberto, obrigado pelas lições de amor que me ensinaram durante a vida, obrigado por tudo que fizeram, sem que ao menos eu soubesse; obrigado pela companhia durante as inúmeras viagens. Apesar da distância e da saudade sua presença sempre me guia, conforta e motiva.

A minha esposa Graciela, paixão da minha vida, obrigado por acreditar em nossos sonhos, pela compreensão da minha ausência, pelo amor, companheirismo e pela incondicional amizade. Dedico a ti esta vitória, obrigado e parabéns.

Ao meu filho Érico, contigo aprendi uma das coisas mais importantes da vida, que não está escrito em lugar algum, o significado do “amor incondicional”. Espero um dia retribuir todo esse aprendizado. Desculpa pela ausência; desculpa as brincadeiras ainda não realizadas....

Aos meus irmãos Luiz Paulo, Daniel, Alberto e Luciana, obrigado pelo companheirismo, apoio e experiências trocadas durante todos estes anos.

A minha orientadora Prof. Dra. Maria Martha Campos, sua paixão pela ciência contagia de uma forma mágica, sempre serena, e com uma ótima solução para todos os problemas. Exemplo raro de pesquisadora e amiga. Muito obrigado pela incansável dedicação em todas as etapas deste trabalho, pelos exemplos de vida, pela imensa paciência, pelo incentivo. Muito obrigado por demonstrar inúmeras vezes que nem tudo está perdido, Sem o seu auxílio seria impossível a realização deste trabalho.

Ao coordenador do Programa de Pós Graduação da PUCR, Prof. Dr. José Antonio Poli Figueiredo, pelas experiências compartilhadas, pela amizade, pelo companheirismo pelo incentivo e por sua dedicação e amor à causa Acadêmica.

Ao meu colega e amigo Charles da Cunha Pereira, parceiro de muitas viagens, obrigado pela companhia, pela grande amizade, coleguismo e apoio no decorrer do curso.

As amigas e Bolsistas de Iniciação Científica Luciana Zolmman e Patrícia Oliboni, vocês foram fundamentais na realização deste trabalho, foram o braço forte, quem realmente trabalhou pesado durante minha ausência. Sem a ajuda de vocês simplesmente não conseguiria ter feito nada. Meu muito obrigado.

A Prof. Dra Adriana Etgs pela sua inestimável ajuda em decifrar os mistérios da histologia.

Aos amigos Fernanda Morrone, Carlos Leite pela grande ajuda na realização deste trabalho.

A amiga Camile Ferreira pelo auxílio e organização durante este trabalho.

Aos colegas de Mestrado e Doutorado da PUCRS pelos fortes laços de amizade, inúmeras experiências compartilhadas e pela formação do “Biofilme”.

Aos colegas da Uningá, por entenderem e apoiarem a minha ausência.

Aos colegas da UNIFRA, em especial a Coordenadora Ana Maria Chagas e a Prof. Janice Marin por terem me recebido tão bem nesta instituição de Ensino.

A Pontifícia Universidade Católica (PUCRS), por ter possibilitado o acesso a este programa de Pós Graduação.

Ao Laboratório de Toxicologia (INTOX), pela acolhida carinhosa, pela disposição de materiais e equipamentos.

Ao Funcionário Juliano Soares, pela ajuda e dedicação sempre demonstrada no cuidado dos animais.

A Silvana Pereira de Souza, pela indispensável ajuda e paciência durante a realização dos cortes histológicos.

A minha grande amiga e colega Salete Pozatti, pela convivência fraterna e amiga durante todos estes anos.

Ao grande mestre, incentivador e amigo Dr. Ermeto Muller, pelas incontáveis experiências compartilhadas, pela amizade, companheirismo, incentivo, sempre demonstrando os caminhos da ética e da honestidade.

Aos companheiros da *CONFRARIA DOS CAVALEIROS DO ARENAL*, Prof. Dr. Marcelo Ustra Soares e Cel. João Candido Brillhante pelos fortes laços de imensa amizade, apreço e companheirismo.

RESUMO

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de dois modelos de desordens metabólicas, cardiomiopatia e diabetes do tipo 2, no desenvolvimento de lesões periapicais em ratos, bem como, analisar o possível benefício do tratamento com o composto antioxidante, tempol, nestes modelos. Inicialmente, para avaliar o efeito do tempol em lesões periapicais de ratos com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina, foram utilizados 40 ratos divididos em quatro grupos: (1) ratos tratados com solução salina (10 ml/kg, durante 21 dias após a indução da lesão periapical) por via oral; (2) ratos tratados com tempol (30 e 50 mg/kg, durante 21 dias após a indução da lesão periapical) por via oral; (3) ratos com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina, tratados com solução salina por via oral (10 ml/kg), e, (4) ratos com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina, tratados com tempol (30 e 50 mg/kg, a partir do terceiro dia de tratamento com doxorrubicina, até 21 dias após a indução da lesão periapical). O peso corporal foi registrado durante todo o período experimental. As lesões periapicais foram induzidas no primeiro molar inferior direito. Após 21 dias de indução de periodontite apical, os animais foram eutanasiados e as mandíbulas foram removidas para realização das radiografias e análise histológica. Amostras do fígado e do coração foram retiradas para determinação dos radicais livres. A administração oral de tempol (50 mg/kg) foi eficaz em prevenir significativamente o estabelecimento de lesões periapicais em animais controle e, em ratos submetidos ao modelo de cardiomiopatia induzida por doxorrubicina, de acordo com os resultados observados no exame radiográfico e, corroborados pela análise histológica. No entanto, foi possível observar que os efeitos protetores do tempol, foram virtualmente maiores nos animais controle, quando comparados com ratos tratados com doxorrubicina, como indicado pelas análises histológica e radiográfica. Este fato pode estar relacionado com a produção aumentada de radicais livres nos animais com cardiomiopatia. O tratamento com tempol foi capaz de reverter significativamente a perda de peso corporal

induzida pela doxorrubicina, embora a redução da atividade da catalase não tenha sido significativamente alterada no fígado ou no coração.

Posteriormente, foi investigado o desenvolvimento de lesões periapicais em ratos com diabetes do tipo 2. Nesta etapa, os animais receberam água (N=5) ou uma solução de glicose a 20% (N=15) durante nove semanas. Após a sexta semana, as lesões periapicais foram induzidas nos primeiros molares mandibulares e, os animais foram subdivididos em 4 grupos. O grupo (1) foi composto por ratos não diabéticos, que receberam solução salina por via oral (10 ml/kg). Os ratos tratados com glicose foram divididos nos seguintes subgrupos: (2) animais tratados com solução salina (10 ml/kg por via oral); animais tratados por via oral com tempol (3) 50 mg/kg; ou (4) 100 mg/kg. O ganho de peso corporal foi monitorado durante toda a fase experimental. Após 21 dias de indução de periodontite apical, os animais foram submetidos à eutanásia e, as mandíbulas foram removidas para a análise radiográfica e histológica. Amostras de fígado foram retiradas para determinação dos radicais livres e, o plasma sanguíneo foi utilizado para a determinação dos níveis de insulina. Os animais diabéticos mostraram uma diminuição significativa do ganho de peso e, um ligeiro aumento dos níveis de insulina, com uma redução dos níveis das enzimas antioxidantes, catalase e glutathione-S-transferase (GSH). Essas alterações foram revertidas com a administração do tempol, na dose de 100 mg/kg. A extensão e a celularidade das lesões periapicais dos ratos com diabetes tipo 2 foi semelhante ao observado nos ratos controle. Entretanto, a administração de tempol, mesmo na dose de 100 mg/kg, não foi capaz de alterar as lesões periapicais em ratos diabéticos, sugerindo que a terapia sistêmica com tempol foi ineficaz em ratos submetidos ao consumo de altas concentrações de glicose.

Em conclusão, o tratamento com antioxidante tempol apresentou efeitos sistêmicos benéficos sobre a periodontite apical de animais com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina e em ratos controle. Entretanto, apesar de afetar outros parâmetros relacionados

com o diabetes, o tempol não foi eficiente em melhorar os resultados de lesões endodônticas em animais com diabetes tipo 2. Estes dados podem ser úteis para auxiliar no plano de tratamento de pacientes com desordens metabólicas que procuram por tratamento endodôntico. Outras estratégias terapêuticas devem ser avaliadas nos mesmos modelos experimentais, incluindo a utilização de curativos de demora contendo tempol, bem como, a associação com fármacos hipoglicemiantes, como a metformina.

DESCRITORES¹

Terapia antioxidante, Tempol, cardiomiopatia, Diabetes, Periodontite Apical, Ratos.

¹DeCS- Descritores em Ciências da Saúde, disponível em [HTTP://descs.bvs.br](http://descs.bvs.br)

ABSTRACT

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the influence of two models of metabolic disorders, cardiomyopathy and type 2 diabetes, on periapical lesions in rats, and to evaluate the possible benefits of treatment with the antioxidant compound tempol in these experimental models. Initially, to assess the effects of tempol in periapical lesions of rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy, 40 Male Wistar rats were divided into four groups: (i) naïve rats orally treated with saline solution (10 ml/kg) during 21 days after periapical lesion induction); (ii) naïve rats treated with tempol (30 and 50 mg/kg, during 21 days after periapical lesion induction), by oral pathway; (iii) rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy treated with saline solution by oral route (10 ml/kg, from day 3 to day 21 after initiating treatment with doxorubicin); and (iv) rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy orally treated with tempol (30 and 50 mg/kg, , from day 3 to day 21 after initiating treatment with doxorubicin). Body weight was recorded throughout the experimental period. Periapical lesions were induced on the first right mandibular molar tooth. Following 21 days of apical periodontitis induction, the animals were euthanized, and the mandibles were collected for radiographic and histological analysis. Samples of livers and hearts were removed for determination of free radicals. The oral administration of tempol (50 mg/kg) was able to significantly prevent the establishment of periapical lesions in either control animals or in rats submitted to the model of doxorubicin-induced cardiomyopathy, according to radiographic and histological evaluation. Nevertheless, the protective effects of tempol were virtually greater in control animals, in comparison to doxorubicin-treated rats, as indicated by histological inflammatory assessment. This might be related to the increased production of free radicals under cardiomyopathy. Treatment with tempol was able to reverse significant weight loss induced by doxorubicin, although the reduction of catalase activity was not significantly altered in the liver or heart.

Subsequently, we investigated the development of periapical lesions in rats with type 2 diabetes. In this part of the study, 20 Male Wistar rats were used; they received tap water (N= 5) or a 20%-glucose solution (N = 15) during nine weeks. At the sixth week, periapical lesions were induced on the first mandibular molars, and the animals were subdivided into four groups. The subgroup (i) was composed by non-diabetic rats orally receiving saline solution (10 ml/kg). Glucose-fed insulin resistant rats were divided into the following subgroups: (ii) saline-treated animals (10 ml/kg, by oral route); animals orally treated with tempol (iii) 50 mg/kg; or (iv) 100 mg/kg. The body weight was monitored thoroughly. Following 21 days of apical periodontitis induction, the animals were euthanized, and the mandibles were collected for radiographic and histological analysis. The livers were removed to determine free radicals and the blood plasma was used to measure insulin levels. Type-2 diabetic rats displayed a significant decrease of body weight gain and a slight increase of insulin levels, allied to reduced levels of the antioxidant components catalase and GSH; these alterations were virtually reversed by tempol (100 mg/kg). The extent and cellularity of periapical lesions in glucose-fed type 2 diabetic rats was similar to that seen in control rats. However, administration of tempol, even at a dose of 100 mg/kg, was not able to change the periapical lesions in diabetic rats, suggesting that systemic therapy with tempol was ineffective in rats submitted to a high-glucose diet.

In conclusion, treatment with tempol showed beneficial systemic effects on apical periodontitis in both control animals and in rats with doxorubicin-elicited cardiomyopathy, at the dose of 50 mg/kg. However, despite affecting other parameters related to diabetes, tempol (for up to 100 mg/kg) failed to improve the outcome of endodontic lesions in type-2 diabetic animals. This data might be useful to support the treatment planning for patients with metabolic disorders looking for endodontic treatment. Other therapeutic strategies should be

evaluated in the same experimental models, including the use of intracanal dressings containing tempol, as well as the association with hypoglycemic agents, such as metformin.

DESCRIPTORS²

Antioxidant Therapy, Tempol, Cardiomyopathy, Diabetes, Periapical Periodontitis, Rats

²MsSH – Medical Subject Headings, available at: www.nlm.nih.gov/mesh

LISTA DE ABREVIATURAS

HDL: Lipoproteínas de Alto Peso Molecular.

LDL: Lipoproteínas de Baixa Densidade .

AGEs: Produtos finais de Glicação.

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

RNA: Ácido Ribonucleico

GSH: Glutathiona Reduzida

ROS: Reactive Oxygen Species

NIH: National Institutes for Health

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia/PUCRS	86
Anexo B: Aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animais/PUCRS	87
Anexo C: Aceitação do Artigo 1 pelo Periódico <i>Journal of Endodontics</i>	88
Anexo D: Submissão do Artigo 2 ao Periódico <i>Journal of Endodontics</i>	89

SUMÁRIO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	22
OBJETIVOS	31
Objetivo Geral	31
Objetivo Específico	31
ARTIGO DE PESQUISA 1	33
Abstract.....	35
Introduction	36
Material e Methods.....	38
Results.	41
Discussion.....	43
References	46
ARTIGO DE PESQUISA 2	53
Abstract	55
Introduction	56
Material e Methods.....	57
Results	61
Discussion.....	62
References	71
DISCUSSÃO GERAL	74
CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS	85

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, tem aumentado consideravelmente o número de pacientes portadores de doenças sistêmicas que buscam atendimento odontológico, como é o caso dos cardiopatas, hipertensos e diabéticos. Esta condição está especialmente relacionada ao aumento na expectativa de vida, possibilitada pelos avanços da Medicina nas últimas décadas. Esses pacientes possuem uma série alterações metabólicas, vasculares e endócrinas, além de alterações do sistema imune. Assim, os profissionais de Odontologia devem estar conscientes da relação entre as desordens sistêmicas e suas complicações, para que possam adotar medidas que minimizem seus efeitos, durante o tratamento odontológico.

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de mortalidade nos países ocidentais. A principal etiologia das complicações cardíacas está relacionada com a aterosclerose. Existem vários fatores de risco e estados patológicos relacionados com a formação inicial e progressão da lesão aterosclerótica. Entre os mais relevantes estão tabagismo, hipertensão arterial, hiperlipidemia, diabetes, níveis baixos de lipoproteínas de alto peso molecular (HDL) e idade avançada. Além destes, existem outros fatores predisponentes, como obesidade, sedentarismo, estresse, dieta, histórico familiar, além de fatores genéticos e raciais (1).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica complexa que afeta as grandes e médias artérias, por meio da formação de placas ateroscleróticas na parede do vaso, precipitadas pela elevação dos níveis de colesterol ligados a lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no sangue, alterações no fenótipo de células vasculares, além de áreas de necrose e fibrose no tecido circundante (2, 3). A placa aterosclerótica possui três componentes principais: o colesterol, constituído de ésteres de colesterol na sua maior parte; células musculares lisas, macrófagos e outros elementos celulares e, finalmente, proteínas fibrosas (4, 5).

A aterosclerose é originada de uma resposta inflamatória crônica a diferentes mecanismos lesivos à parede vascular. Sofre a ação de inúmeros fatores de crescimento como citocinas, substâncias produzidas pelas células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos e linfócitos T, que regulam a resposta inflamatória e a proliferação celular. No final da década de 70, foi proposto pela primeira vez que o LDL sofre alterações oxidativas que o tornam alvo de receptores específicos em macrófagos que, posteriormente, incorporam o LDL modificado na placa aterosclerótica. De forma relevante, este processo pode ser prevenido por compostos antioxidantes (6).

O diabetes é uma doença sistêmica, que compreende um grupo de desordens metabólicas complexas, caracterizada pela deficiência parcial ou total na secreção de insulina ou, por resistência à ação da insulina, levando a uma variedade de alterações envolvendo o metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. Isso acarreta uma utilização inadequada dos carboidratos e alterações no metabolismo protéico, o que gera uma alta taxa de glicose (hiperglicemia) no sangue (7-9).

O diabetes afeta cerca de 1,5 milhões de pessoas em todo mundo e, os pacientes podem desenvolver inúmeras desordens sistêmicas, como doença micro/macro-vascular (angiopatia), hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, alterações na permeabilidade vascular e doença vascular periférica, podendo ocasionar gangrenas e amputações. Esta doença também causa disfunções nos neutrófilos, nos rins (nefropatia), nos olhos (retinopatia) e no sistema nervoso (neuropatia), além da redução na síntese e maturação do colágeno (4, 8-12).

Com base na etiologia da doença, o diabetes pode ser classificado em tipo 1, também chamado de insulino-dependente e, tipo 2 ou, não insulino-dependente. Além desses tipos, existem formas específicas da doença como endocrinopatias auto-imunes, alterações causadas por infecções (como a rubéola) e aquelas induzidas por drogas ou gravidez (7, 12).

Os pacientes portadores de diabetes tipo 1 representam 10 % dos casos. Neste tipo de diabetes, que possui forte predisposição genética, a etiologia mais comum é a destruição auto-imune das células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas, praticamente cessando a produção de insulina; mesmo quando a insulina é produzida, sua quantidade é insignificante (13). A perda de tecido pancreático causada por pancreatite, remoção cirúrgica ou destruição por fibrose cística também pode resultar em pacientes insulino-dependentes. A administração de insulina é essencial para os pacientes com diabetes tipo 1, para que seja evitada a desidratação grave causada pela hiperglicemia e cetoacidose, que pode levar ao coma e morte de forma rápida (8). O diabetes do tipo 1 se desenvolve em indivíduos jovens, geralmente até os 30 anos de idade, podendo, em alguns casos, ser diagnosticado posteriormente. Os principais sintomas são poliúria, polifagia e polidipsia, irritabilidade, sede e fome excessivas. Os sintomas são reduzidos com a instauração de esquemas adequados de insulino-terapia (14).

O diabetes tipo 2 é a forma mais comum da doença, sendo responsável por cerca de 90 % dos casos. Ocorre geralmente em adultos e é caracterizado pela diminuição na resposta à insulina dos receptores de glicose, presentes nos tecidos periféricos, principalmente em adipócitos e células musculares, levando ao fenômeno chamado de “resistência insulínica”. Geralmente, ocorre uma grande produção de insulina, na tentativa de que essas células reconheçam sua presença. A incidência do diabetes do tipo 2 possui, geralmente, uma base familiar e está relacionada com hábitos de vida, como má-alimentação, sedentarismo e aumento da massa corpórea. Outros fatores de risco incluem hipertensão arterial, tabagismo, alcoolismo, além de histórico de diabetes gestacional e fatores psicossociais, como estresse e depressão. A obesidade é considerada um fator de risco determinante para o desenvolvimento do diabetes tipo 2, pois, em 80 % dos casos, os pacientes apresentam sobrepeso, especificamente quando ocorre o aumento da relação cintura-quadril (7, 12). O tratamento para este tipo de diabetes deve ser baseado, inicialmente, em terapia nutricional, perda de

peso, além do aumento da atividade física. No caso de insucesso, alguns pacientes necessitam de tratamento com hipoglicemiantes orais e, eventualmente, será necessária a administração de insulina suficiente para controle glicêmico, com o objetivo de evitar a cetoacidose (8).

Em relação à saúde bucal, o diabetes pode causar grandes transtornos aos tecidos orais, apresentando um amplo espectro de manifestações como xerostomia, perda da sensação gustativa ao doce, sialose, além de alterar a progressão de doenças como cárie dentária, doença periodontal e lesões de tecidos moles. Ademais, estes pacientes são mais propensos a infecções bacterianas e fúngicas, como a candidíase. O diabetes pode ser um fator modulador de infecções endodônticas e comprometer a cicatrização de lesões periapicais, principalmente quando a doença estiver mal controlada (7, 9, 13-16).

Estudos realizados em modelos animais permitem uma análise mais específica das hipóteses, pois possibilitam um maior controle e um menor número de variáveis. Alguns aspectos são difíceis de serem padronizados e testados em estudos clínicos, como idade, hábitos alimentares, interações medicamentosas e associação com outras enfermidades. Nos modelos animais, a patogênese das periapicopatias pode ser mais bem estudada, pois os espécimes podem ser examinados radiograficamente, por histologia e bioquimicamente.

Alguns modelos animais têm sido utilizados para o estudo das cardiomiopatias e sua relação com a produção de radicais livres. As antraciclina representam um grupo de medicamentos utilizados na quimioterapia de diversos tipos de câncer, cujo principal representante é a doxorubicina (adriamicina). Um dos principais efeitos adversos causados por esta classe de fármacos é a cardiotoxicidade. Os danos cardíacos ocasionados pela doxorubicina podem ser assintomáticos e presentes mesmo depois de meses do final do tratamento, provocando insuficiência cardíaca congestiva. Os mecanismos responsáveis por essa cardiomiopatia são multifatoriais, mas estão especialmente relacionados com a ocorrência de danos oxidativos. Foi demonstrado que o núcleo das antraciclina é convertido

no radical livre semiquinona, ocasionando danos celulares e alterações inflamatórias, que podem ser prevenidos por agentes antioxidantes (17, 18).

Alguns dados com modelos animais têm corroborado os resultados de estudos clínicos, demonstrando os possíveis efeitos do diabetes sobre as lesões periapicais em ratos. Níveis elevados de glicose no sangue estão relacionados com uma série de mecanismos patológicos, como a formação de produtos finais de glicação (AGEs), que aumenta os efeitos do estresse oxidativo e altera o metabolismo lipídico (9). O estresse oxidativo ocorre quando um sistema celular produz uma quantidade de radicais livres que extrapola a capacidade antioxidante deste sistema. Caso os radicais livres não sejam removidos pelos agentes antioxidantes, ocorrerá dano em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, levando à diminuição de atividades biológicas importantes, como transporte e sinalização celular, além de perda de energia no metabolismo e de outras funções essenciais, o que pode resultar em morte celular (10). O aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio é um fator determinante para a progressão do diabetes e suas complicações (19).

O desenvolvimento do diabetes está fortemente relacionado com o aumento do estresse oxidativo, podendo ser consequência do aumento na produção de radicais livres ou da redução das defesas antioxidantes. O estresse oxidativo pode estar associado ao aparecimento de complicações tardias do diabetes, como polineuropatia e catarata, além de resistência à insulina (20). Por exemplo, foi demonstrado experimentalmente, que a ativação de sistemas antioxidantes poderia impedir a destruição de células β das ilhotas de Langerhans, melhorar a absorção de glicose, além de retardar o desenvolvimento de neuropatia diabética (20).

As principais fontes de radicais livres são as mitocôndrias, onde estes são gerados como subprodutos naturais do metabolismo celular. Além disso, eles podem ser gerados por uma grande variedade de fontes, em resposta a processos patológicos (21). Os radicais livres reagem com o substrato biológico que ocasionam danos às biomoléculas, que pode

comprometer a saúde do indivíduo. As conseqüências mais graves são aquelas geradas sobre DNA e RNA, pois alteram a ordem das bases, capaz de desencadear oncogênese. No caso da oxidação de lipídeos, se ocorrer na membrana, pode haver alterações no transporte de substâncias, podendo haver ruptura e morte celular. Já no sangue, a oxidação de lipídeos causa danos às paredes dos vasos, facilitando o acúmulo de lipídeos (22).

No que se refere à infecção endodôntica, Brito et al. (1996) (23) avaliaram a relação potencial entre o diabetes e o comprometimento da resposta dos tecidos periapicais à infecção. Foram utilizadas radiografias para investigar a prevalência de áreas radiolúcidas periapicais em 30 pacientes com diabetes, em dentes com e sem tratamento endodôntico, em comparação com as imagens obtidas de 23 indivíduos saudáveis. Os autores concluíram que pacientes com diabetes tipo 2, submetidos a tratamento endodôntico, apresentaram um número maior de lesões residuais após o tratamento.

Fouad et al. 2003 (24) demonstram que o índice de sucesso de endodontias em dentes com lesões periapicais, após dois anos de controle, foi significativamente menor nos pacientes portadores de diabetes, em comparação com os pacientes não diabéticos. Os autores correlacionaram estes achados a alterações na resposta imune dos pacientes diabéticos, tais como diminuição na aderência leucocitária, quimiotaxia e fagocitose, além do aumento da aderência dos microorganismos nas células dos pacientes diabéticos.

Mindiola et al. (25) 2006 realizaram um estudo epidemiológico em uma população de nativos norte-americanos, no período de 1991 a 2000; todos os dados foram obtidos a partir de registros eletrônicos. Os autores descreveram um aumento na perda dentes tratados endodonticamente em pacientes com diabetes; foi encontrada uma taxa de 3,9 % (145 de 3753 dos casos) de dentes perdidos em pacientes sem doença sistêmica, enquanto em pacientes com diabetes, este número aumentou para 10,3 % (24 de 232 dos casos).

Indícios para a ocorrência de estresse oxidativo no tecido pulpar, resultante de diabetes, foram demonstrados por Leite et al. 2008 (15). Os autores sugeriram que o diabetes pode alterar de forma significativa os parâmetros do sistema antioxidante do tecido pulpar. Essas mudanças são caracterizadas por aumento na atividade da catalase e redução do teor de ácido sialítico, indicando que a polpa dentária poderia ter respostas prejudicadas.

A relação entre o diabetes tipo 2 e o desenvolvimento de lesões periapicais em ratos foi investigada após a indução de hiperglicemia pela ingestão de solução de sacarose 30 %, em ratos com diabetes tipo 2 (seleção genética) e animais normais. A análise histológica mostrou que a reabsorção óssea alveolar foi mais grave e as lesões perirradiculares foram maiores nos animais diabéticos que ingeriram solução com sacarose (26). Os autores sugeriram que a redução dos níveis de insulina e a hiperglicemia tornaram os animais mais sensíveis ao desenvolvimento de lesões perirradiculares. Outra justificativa para a ocorrência de lesões periapicais mais severas nos ratos diabéticos que ingeriram solução de sacarose poderia estar relacionada a um balanço negativo de cálcio no organismo, levando à redução na remodelação e no crescimento ósseo.

Um dos achados nutricionais mais importantes das últimas décadas, que possui reflexos positivos para a saúde pública, foi a constatação de que o consumo elevado de alguns alimentos proporciona proteção significativa contra inúmeras doenças crônicas, como doenças cardiovasculares. Essa observação pode estar relacionada com o grande número de compostos químicos contidos nos mesmos, já que muitos são potentes antioxidantes. Moléculas com capacidade antioxidante podem ter origem intrínseca (no sangue, nas células ou nos tecidos) e, podem ser adquiridas por dieta ou, ainda, pela administração de medicamentos (6, 27).

Estudos recentes (28), têm demonstrado que a administração de fármacos antioxidantes pode melhorar várias complicações associadas à diabetes tipo 2, como estados neuropáticos. Medicamentos utilizados no combate a diabetes, que apresentam propriedades antioxidantes

como a metformina, se mostraram efetivas em diminuir a área de perda óssea periapical em relação a animais controle (29).

Existem vários tipos de antioxidantes, incluindo os carotenoides, a bilirrubina, a ubiquinona e o ácido úrico; entretanto, os mais importantes no combate ao estresse oxidativo são os tocoferóis e o ácido ascórbico. Desenvolvido na década de 70, o tempol (4-hidróxi-2, 2,6,6-tetrametil piperidinoxil) é um antioxidante estável, hidrofílico, de baixo peso molecular, que apresenta excelente permeabilidade celular. Seus efeitos compreendem a redução do estresse oxidativo, diminuição da pressão arterial e melhora da disfunção renal (30, 31). Estudos relatam a eficácia do tempol em atenuar alterações vasculares, renais e cardíacas em diabéticos (32, 33), bem como, na redução da intensidade do dano tecidual em modelos animais de inflamação local e sistêmica (34, 35). A eficácia do tempol pode estar relacionada aos seus múltiplos mecanismos de ação antioxidante e sua capacidade de afetar espécies reativas de oxigênio na membrana, tanto, intra quanto extracelularmente (30, 36).

Apesar das evidências acerca da influência do diabetes e de cardiomiopatias no comportamento das lesões de origem endodôntica, ainda existe pouca informação sobre os efeitos dessas desordens metabólicas em relação ao desenvolvimento e reparo de lesões periapicais. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o desenvolvimento de lesões periapicais em ratos, em modelos animais de alterações metabólicas e investigar como o tratamento com o agente antioxidante tempol interfere nesse processo.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de desordens metabólicas no desenvolvimento de lesões periapicais em ratos, bem como, analisar o possível benefício do tratamento com o antioxidante, tempol, neste contexto.

Objetivos específicos

- a) Avaliar o desenvolvimento de lesões periapicais em ratos com diabetes tipo 2;
- b) Avaliar o desenvolvimento de lesões periapicais em ratos com cardiomiopatia induzida pela doxorrubicina;
- c) Avaliar o efeito da administração do antioxidante tempol, no desenvolvimento de lesões periapicais em ratos diabéticos;
- d) Avaliar o efeito da administração do antioxidante tempol, no desenvolvimento de lesões periapicais em ratos portadores de cardiomiopatia.

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I

ARTIGO 1

Effects of the antioxidant agent tempol on periapical lesions in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy.

Publicado no Periódico *Journal of Endodontics*, Qualis A1 e Fator de Impacto 2,953

(Anexo A).

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* 2011;38(2):191-195.

Title: Effects of the antioxidant agent tempol on periapical lesions in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy

Author names and affiliations: Carlos Frederico Brilhante Wolle¹, Luciana de Aguiar Zollmann², Adriana Etges³, Graciela Schneider Vitalis⁴, Carlos Eduardo Leite⁵, Maria Martha Campos^{1,5}.

¹Postgraduate Program of Dental College, PUCRS; ²Faculty of Pharmacy, PUCRS; ³Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brazil; ⁴Postgraduate Program of Nano Science College, UNIFRA; ⁵Institute of Toxicology, PUCRS.

Corresponding Author: Maria Martha Campos, School of Dentistry, 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; E-mail: camposmmartha@yahoo.com; maria.campos@pucrs.br

Abstract

Objectives: Cardiovascular diseases have been associated with increased risk of endodontic complications. This study evaluated the effects of the antioxidant agent tempol on periapical lesions in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy in comparison to control animals.

Methods: Forty Male Wistar rats were divided into four groups: (i) naïve rats orally treated with saline solution (10 ml/kg) during 21 days after periapical lesion induction); (ii) naïve rats treated with tempol (30 and 50 mg/kg, during 21 days after periapical lesion induction), by oral pathway; (iii) rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy treated with saline solution by oral route (10 ml/kg, from day 3 to day 10 after initiating treatment with doxorubicin); and (iv) rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy orally treated with tempol (30 and 50 mg/kg, , from day 3 to day 10 after initiating treatment with doxorubicin). Periapical lesions were induced on the first right mandibular molar tooth. Following 21 days of apical periodontitis induction, the animals were euthanized, and the mandibles were collected for radiographic and histological analysis.

Results: The oral administration of tempol (50 mg/kg) was able to significantly prevent the establishment of periapical lesions in either control animals or in rats submitted to the model of doxorubicin-induced cardiomyopathy, according to radiographic and histological evaluation. Nevertheless, the protective effects of tempol were virtually greater in control animals, in comparison to doxorubicin-treated rats, as indicated by histological inflammatory assessment, what might be related to the increased production of free radicals under cardiomyopathy.

Conclusions: We provide novel evidence on the beneficial systemic effects of the antioxidant tempol on apical periodontitis in both control animals and in rats with doxorubicin-elicited cardiomyopathy.

Keywords: Doxorubicin, cardiomyopathy, rats, periapical periodontitis, antioxidant therapy.

Introduction

Atherosclerosis is a multi-factorial disease accounting for the greatest number of deaths in western countries. It is associated with many risk factors including smoking, dyslipidemia, diabetes, obesity, hypertension and the production of reactive oxygen species (ROS) (1, 2). ROS are mainly originated from the mitochondria, as by-products of the cellular metabolism, but also, from several other sources as a consequence of various diseases (3) . The exaggerated ROS production directly affects the vascular endothelium, leading to the activation of diverse components of the immune system, taking part in cardiovascular diseases (2). Notably, an interesting study conducted by Leite et al. (4) showed clear signs of oxidative stress in the dental pulp obtained from type I diabetic rats. In fact, it has been previously reported that production of ROS is found elevated in diabetic individuals, especially in cases of poor glycemic control (5).

Doxorubicin is an anthracycline chemotherapy agent, with a broad spectrum of action, which is very effective in oncological clinics. However, its use is limited due to the pronounced acute and chronic cardiotoxic effects. The mechanisms responsible for doxorubicin-elicited cardiotoxicity are multi-factorial, but it is now well-known that oxidative stress plays an important role in this process (6).

It has been described that patients suffering from cardiovascular diseases have a higher number of oral chronic infections, besides having a greater need of restorative, periodontal and endodontic treatment (7). Of note, coronary arterial disease generates a higher incidence of pulp stones (8), and it has been recently associated with an increased risk of tooth extraction after root canal treatment (9). Nevertheless, further studies on this regard are still needed.

Recent evidence has pointed out antioxidant compounds as attractive tools for treating several pathological alterations, such as atherosclerosis, as well as infectious diseases (10).

Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine- N-oxy) is a stable piperidine nitroxide of low molecular weight, which permeates biologic membranes and scavenges superoxide anions *in vitro*, exerting beneficial effects in rats subjected to endotoxemia (11). Furthermore, there is compelling evidence showing the great effectiveness of tempol in animal models of ischemia–reperfusion injury, hypertension, diabetes and endothelial cell dysfunction (12).

The present study was designed to assess the effects of treatment with the antioxidant agent tempol on apical periodontitis establishment in rats with doxorubicin-induced cardiopathy, in relation to control animals.

Material and Methods

Animals

All animal procedures were performed according with the Guide for the Care and use of Laboratory Animals, published by National Institutes for Health (NIH). The methodology was approved by the local animal ethics committee (CEUA) of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (RS, Brazil). In this study, 40 male Wistar rats (weighting 240 to 280g at the beginning of the experiments) were used. They were housed under standard controlled conditions (temperature: 22 ± 1 °C, 70% humidity, and a 12h/12h light-dark cycle) and received a standard rat chow diet (Nuvilab), with free access to filtered water.

Doxorubicin-induced cardiomyopathy

For the induction of cardiomyopathy, the methodology described by Richard et al. (6) was adopted. The animals received doxorubicin (1mg/kg/day), by i.p. route, from day 0 to day 10. A total dose of 10 mg/kg was administered over the 10-days period of disease induction. Control animals received saline solution (0.9 % NaCl) at the same schedule of administration. The body weight of animals (in grams) was registered throughout all the experimental period. Additional toxicity signs, such as piloerection and alteration of motor activity were also registered.

Protocols of treatment with tempol

The animals were divided into four groups: group 1, naïve rats orally treated with saline solution (10 ml/kg, during 21 days after periapical lesion induction); group 2, naïve rats treated with tempol (30 and 50 mg/kg, during 21 days after periapical lesion induction), by oral pathway; group 3, rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy treated with saline solution by oral route (10 ml/kg, from day 3 to day 10 after initiating treatment with

doxorubicin); and group 4, rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy orally treated with the anti-oxidant agent tempol (30 and 50 mg/kg, , from day 3 to day 10 after initiating treatment with doxorubicin).

Periapical lesion induction

Periapical lesion induction was performed as previously described, with minor adaptations (13, 14). Rats were anesthetized by i.p. injection of an association of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg). The pulps of the mandibular first molars were surgically exposed with a ¼ size round steel bur in high-speed rotation, under constant irrigation. As a systemic model of disease was used, we have opted for using only one tooth per animal. Pulpas were left open to the oral cavity for 21 days in order to allow periapical lesion establishment.

Radiographic analysis

Radiographs were taken in order to form a perpendicular angle with the vestibular surface of the first molars. A focal distance of 30 cm was kept. The x-ray unit (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brazil) operated at 50 kVp, with a size-2 phosphor plate (Gendex, Chicago, IL, USA), and an exposure time of 0.2 s. Digital x-ray system (Denoptix/Gendex, IL, USA) was used to capture images scanned at 300 dpi resolution, and saved in TIFF format. Image analysis was performed using the software Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated®), by an examiner blind to the experimental groups, as previously described (15).

Histopathological analysis

Following 21 days of periapical lesion induction, the animals were euthanized by deep anesthesia with isoflurane. The mandibles were then surgically removed, dissected, fixed in

10% neutral-buffered formalin solution. The specimens were processed at the Laboratory of Histopathology (School of Dentistry, UFPEL). The samples were demineralized with 5% nitric acid (pH 7.4), which was renewed every 2 days. For the histopathological analysis, the methodology described by Iwama et al. (13) was accomplished. Briefly, paraffin blocks containing the mandibles were serially sectioned with average thickness of 6 μm in a mesio-distal plane. Sections were stained with hematoxylin and eosin, and examined under light microscopy (200x magnification). Two histological slides (four fields in each) were evaluated for every tooth, which included the root dentin, the apical foramen and the periapical tissues. The intensity of inflammatory infiltrate was classified according to the following scores: 0, absent; 1, discrete; 2, moderate; or 3, severe (14), by a skilled pathologist blind to the experimental groups (16, 17).

Free radical production

In order to confirm the cardiomyopathy in the doxorubicin groups, following euthanasia, both the hearts and the livers were immediately collected and submitted to biochemical analysis to determine catalase activity, a classical indicator of tissue oxidative stress (18).

Statistical Analysis

The results were expressed as mean \pm standard error of mean of 5-8 animals in each experimental group. The sample size was established on the basis of previous literature studies (15, 19), and by using the statistical program GraphPad InStat (GraphPad Software Inc, San Diego, CA) for $P < 0.05$. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's *post-hoc* test.

Results

Effect of tempol on periapical lesions in normal rats

The results presented in the Figure 1 demonstrate that systemic treatment with the antioxidant agent tempol (50 mg/kg; p.o.) was able to significantly reduce the development of periapical lesions in naïve rats, when administered during 21 days. On the other hand, the oral administration of tempol, at the dose of 30 mg/kg, failed to significantly alter the establishment of periapical lesions ($P>0.05$). At the radiographic evaluation, the treatment with tempol (50 mg/kg) caused a marked reduction of the area of periapical lesions, with an inhibition percentage of $52 \pm 7\%$ (Figure 1D; $P < 0.01$). In addition, tempol (50 mg/kg) was also greatly effective in reducing the inflammatory score ($90 \pm 10\%$; $P<0.05$), as determined on the basis of histological analysis (Figure 1H). Representative images on the effects of treatment with tempol (30 and 50 mg/kg) are provided in the Figure 1A-C (radiographic data) and 1E-G (histological findings).

Induction of cardiomyopathy

In an attempt to assess whether the treatment with tempol might also be effective on periapical lesions under cardiovascular diseases, separate groups of rats were treated with the cardiotoxic chemotherapeutic agent doxorubicin. As described beforehand, the administration of doxorubicin (1 mg/kg/day, for 10 days) induced time-related visible systemic changes, such as body weight loss (Figure 2A), piloerection and reduction of motor activity (6). According to the calculation of the area under the curve (Figure 2B), animals in the doxorubicin-control group presented a reduction of $25 \pm 2\%$ in body weight. Furthermore, doxorubicin elicited a significant decrease of liver ($21 \pm 5\%$; Figure 2C) and heart ($24 \pm 9\%$; Figure 2D) catalase activity ($P<0.05$). Of note, the treatment with tempol (50 mg/kg) was able to significantly reverse the body weight loss (Figure 2B; $P<0.05$), an effect that was accompanied by a

general improvement of locomotion, although the reduction of catalase activity was not significantly altered (Figure 2C and D; $P>0.05$).

Effect of tempol on periapical lesions following induction of cardiomyopathy

Concerning the establishment of periapical lesions, doxorubicin-treated animals presented a slight worsening of lesions, as it can be seen by the radiographic analysis. However, this difference was not found to be significant ($P>0.05$). Interestingly, the oral treatment with tempol (50 mg/kg), administered during the period of cardiomyopathy induction, was able to significantly reduce the extent of periapical lesions ($57 \pm 10\%$), as seen in the radiographic analysis (Figure 3D; $P<0.01$). Likewise, the treatment with tempol (50 mg/kg) also significantly diminished the inflammatory scores in the histological analysis ($68 \pm 13\%$) (Figure 3H; $P<0.05$). Again, the 30 mg/kg-dose of tempol failed to significantly alter periapical lesions. The representative images of periapical lesions in doxorubicin-treated groups (control and tempol groups) are provided in the Figure 1A-C (radiographic data) and 1E-G (histological findings).

Discussion

In the present study, we demonstrate, for the first time, that systemic administration of the antioxidant agent tempol was able to prevent apical periodontitis establishment in either control or doxorubicin-treated rats.

Previous studies have demonstrated that tempol reduces the degree of tissue injury in different animal models of local or systemic inflammation (12, 20). Noteworthy, tempol is a water-soluble low molecular weight molecule, what facilitates its permeability throughout biological membranes (6). Therefore, we wondered whether the systemic administration of this compound might be effective in preventing lesion establishment in a rat model of apical periodontitis. Our data convincingly show that oral treatment with tempol, at a 50-mg/kg dose, significantly reduced the periapical lesion areas, as assessed by means of radiographic analysis, an effect that was wholly confirmed by the histological assessment, when compared to the control group. In contrast, the dose of 30 mg/kg failed to significantly alter both inflammatory parameters, what allow us suggesting a dose-dependent effect for tempol. Of high interest, it has been previously demonstrated that epigallocatechin gallate, an active ingredient contained in green tea, was capable of significantly interfering with mechanisms related to bone resorption, as assessed by *in vitro* protocols (21, 22). More recently (23), it was demonstrated that epigallocatechin gallate displayed protective effects in a rat model of apical periodontitis *in vivo*. Furthermore, the oral administration of tempol was found able to markedly inhibit ligature-induced periodontal disease in rats (12).

Recent pieces of evidence have suggested that cardiovascular diseases are associated with an increased risk of tooth extraction after root canal treatment, allied to refractory infections and unresponsiveness to conventional therapies (9). On this regard, we decided to investigate to what extent the antioxidant agent tempol might display protective effects on apical periodontitis development, when dosed to rats submitted to a model of cardiomyopathy.

It has been demonstrated before that chronic administration of the anthracycline compound doxorubicin generates congestive heart failure in rats, representing a very useful animal model of cardiomyopathy (24). The anthraquinone nucleus of anthracycline is reversibly converted to a free radical semiquinone in the presence of molecular oxygen leading to cardiac cellular damage (6). In our study, confirming previous literature data, animals treated with doxorubicin showed a progressive decrease in body weight, in relation to control animals, associated to other signals of toxicity, such as piloerection and decreased locomotor activity. Furthermore, the administration of doxorubicin elicited a diminishment of catalase activity in both the liver and the heart tissues, what indicates an excess free radicals production following doxorubicin administration (24). Of note, the treatment with tempol (50 mg/kg) resulted in a general improvement of cardiomyopathy-related signals, including body weight loss and locomotors deficits. However, the treatment with tempol failed to significantly affect the decrease in catalase activity, although a tendency for a protective effect has been observed. This might be inherent to some methodological concerns, such as the dose of tempol or the antioxidant system assessed in the present study. Nevertheless, our results demonstrated that oral administration of tempol (50 mg/kg) to doxorubicin-treated animals was able to significantly prevent the establishment of periapical lesions, as demonstrated by either radiographic or histological analysis. It is worth mentioning that histologically, the beneficial effects of tempol were virtually greater in control animals, in comparison to doxorubicin-treated rats. This difference might be allied to the increased production of free radicals in rats with cardiomyopathy. Furthermore, rats in the doxorubicin-control group displayed a slight aggravation of apical periodontitis, especially when considering the radiographic analysis. It has been demonstrated that exaggerated free radical production exerts a series of negative actions on the cardiovascular system, through damages by cellular oxidation and disruption of the vascular homeostasis (25, 26). Noteworthy, it was previously demonstrated that metabolic

diseases, such as diabetes, leads to alterations of antioxidant systems (including catalase) in dental pulps of rats (4). Furthermore, it was demonstrated that systemic administration of the natural compound astaxanthin was able to partially prevent the oxidative alterations in dental pulps of alloxan-diabetic rats (18).

All the alterations seen in cardiovascular diseases, might also account for the refractoriness of patients to conventional endodontic treatment, as seen in clinics. It is tempting to suggest that antioxidant therapy might represent a useful adjuvant strategy in patients with cardiovascular diseases, which need to be submitted to endodontic therapies. In this regard, the ability of tempol in crossing biological membranes might account as an additional advantage in the clinical set.

Acknowledgments

L.A.Z. holds an undergraduate grant from the Institutional BPA Program (PUCRS). C.F.W. is a PhD student in Dentistry supported by Pro bolsa 2 (PUCRS). We would like to thank Ms. Silvana Pereira de Souza and Mr. Juliano Soares for their excellent technical assistance. The authors deny any conflicts of interest related to this study.

References

1. Rojas LM, Benitez K, Suarez SM, Boada-Sucre A, Ramirez Y, Romero MA, et al. Ultra structure of retinopathy induced by hyperoxia in developing rats *Rev Invest Clin.* 2005 Nov-Dec;57(6):794-801.
2. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis *Annu Rev Immunol.* 2009;27:165-97.
3. Khavandi K, Khavandi A, Asghar O, Greenstein A, Withers S, Heagerty AM, et al. Diabetic cardiomyopathy--a distinct disease? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009 Jun;23(3):347-60.
4. Leite MF, Ganzerla E, Marques MM, Nicolau J. Diabetes induces metabolic alterations in dental pulp. *J Endod.* 2008 Oct;34(10):1211-4.
5. Wyatt N, Kelly C, Fontana V, Merlo DF, Whitelaw D, Anderson D. The responses of lymphocytes from Asian and Caucasian diabetic patients and non-diabetics to hydrogen peroxide and sodium nitrite in the Comet assay. *Mutat Res.* 2006 Oct 30;609(2):154-64.
6. Richard C, Lauzier B, Delemasure S, Talbot S, Ghibu S, Collin B, et al. Effects of angiotensin-1 converting enzyme inhibition on oxidative stress and bradykinin receptor expression during doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008 Sep;52(3):278-85.
7. Willershausen B, Kasaj A, Willershausen I, Zahorka D, Briseno B, Blettner M, et al. Association between chronic dental infection and acute myocardial infarction. *J Endod.* 2009 May;35(5):626-30.
8. Edds AC, Walden JE, Scheetz JP, Goldsmith LJ, Drisko CL, Eleazer PD. Pilot study of correlation of pulp stones with cardiovascular disease. *J Endod.* 2005 Jul;31(7):504-6.
9. Wang CH, Chueh LH, Chen SC, Feng YC, Hsiao CK, Chiang CP. Impact of diabetes mellitus, hypertension, and coronary artery disease on tooth extraction after nonsurgical endodontic treatment. *J Endod.* 2011 Jan;37(1):1-5.
10. Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M, Matsuoka TA. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2010;453892.
11. Cuzzocrea S, McDonald MC, Mota-Filipe H, Mazzon E, Costantino G, Britti D, et al. Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000 Feb;43(2):320-8.
12. Di Paola R, Mazzon E, Zito D, Maiere D, Britti D, Genovese T, et al. Effects of Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005 Oct;32(10):1062-8.
13. Iwama A, Nishigaki N, Nakamura K, Imaizumi I, Shibata N, Yamasaki M, et al. The effect of high sugar intake on the development of periradicular lesions in rats with type 2 diabetes. *J Dent Res.* 2003 Apr;82(4):322-5.
14. Armada-Dias L, Breda J, Provenzano JC, Breitenbach M, Rocas IN, Gahyva SM, et al. Development of periradicular lesions in normal and diabetic rats. *J Appl Oral Sci.* 2006 Oct;14(5):371-5.
15. Wagner C, Barth VC, Jr., de Oliveira SD, Campos MM. Effectiveness of the proton pump inhibitor omeprazole associated with calcium hydroxide as intracanal medication: An in vivo study. *J Endod.* 2011 Sep;37(9):1253-7.
16. Freddo AL, Rodrigo SM, Massotti FP, Etges A, de Oliveira MG. Effect of low-level laser therapy after implantation of poly-L-lactic/polyglycolic acid in the femurs of rats. *Lasers Med Sci.* 2009 Sep;24(5):721-8.
17. Bergoli RD, Chagas Junior OL, de Souza CE, Vogt BF, de Oliveira HT, Etges A, et al. Isotretinoin effect on alveolar repair after exodontia: a study in rats. *Oral Maxillofac Surg.* 2011 Jun;15(2):85-92.

18. Leite MF, De Lima A, Massuyama MM, Otton R. In vivo astaxanthin treatment partially prevents antioxidant alterations in dental pulp from alloxan-induced diabetic rats. *Int Endod J*. 2010 Nov;43(11):959-67.
19. Scarparo RK, Dondoni L, Bottcher DE, Grecca FS, Rockenbach MI, Batista EL, Jr. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. *J Endod*. 2011 Aug;37(8):1069-73.
20. Sledzinski Z, Wozniak M, Antosiewicz J, Lezoche E, Familiari M, Bertoli E, et al. Protective effect of 4-hydroxy-TEMPOL, a low molecular weight superoxide dismutase mimic, on free radical toxicity in experimental pancreatitis. *Int J Pancreatol*. 1995 Oct;18(2):153-60.
21. Yun JH, Pang EK, Kim CS, Yoo YJ, Cho KS, Chai JK, et al. Inhibitory effects of green tea polyphenol epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts. *J Periodontal Res*. 2004 Oct;39(5):300-7.
22. Yun JH, Kim CS, Cho KS, Chai JK, Kim CK, Choi SH. Epigallocatechin gallate induces apoptosis, via caspase activation, in osteoclasts differentiated from RAW 264.7 cells. *J Periodontal Res*. 2007 Jun;42(3):212-8.
23. Lee YL, Hong CY, Kok SH, Hou KL, Lin YT, Chen MH, et al. An extract of green tea, epigallocatechin-3-gallate, reduces periapical lesions by inhibiting cysteine-rich 61 expression in osteoblasts. *J Endod*. 2009 Feb;35(2):206-11.
24. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis*. 2007 Mar-Apr;49(5):330-52.
25. Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004 Oct;84(4):1381-478.
26. Lessner SM, Prado HL, Waller EK, Galis ZS. Atherosclerotic lesions grow through recruitment and proliferation of circulating monocytes in a murine model. *Am J Pathol*. 2002 Jun;160(6):2145-55.

Legends to the Figures

Figure 1 – Effects of systemic treatment with tempol (30 and 50 mg/kg; p.o.) on the extent of periapical lesions in normal rats: radiographic (D) and histological (H) analysis. The columns represent the mean of 5 to 8 experiments and the vertical lines indicate the standard error mean. *P<0.05. (A, B and C) Representative radiographic images of periapical lesions in control and tempol groups (30 mg/kg and 50 mg/kg), respectively. (E, F and G) Representative images of histopathological analysis in control and tempol groups (30 mg/kg and 50 mg/kg), respectively. (►) Extension of the inflammatory process.

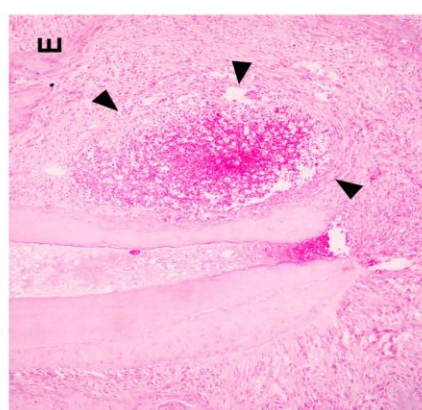
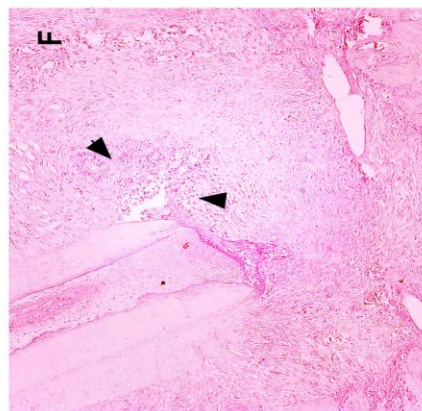
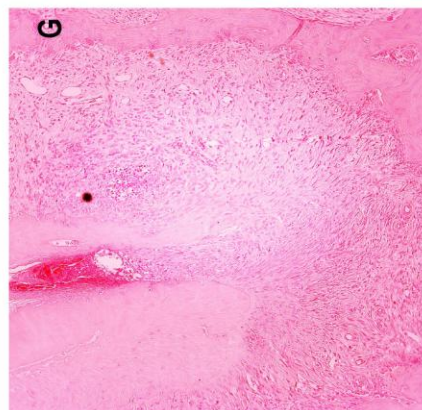
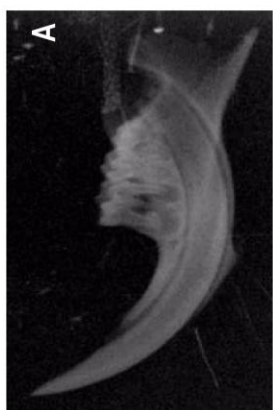
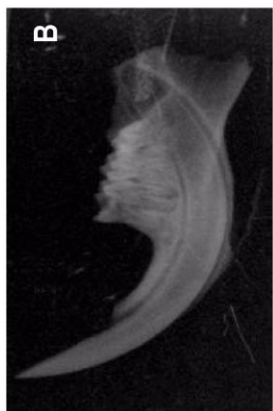
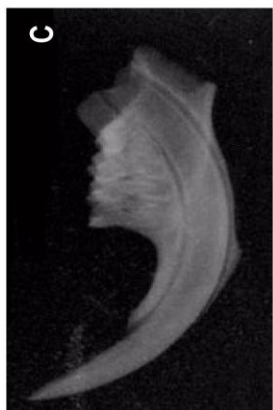
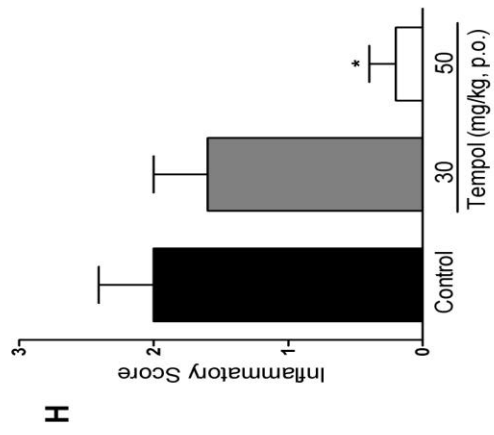
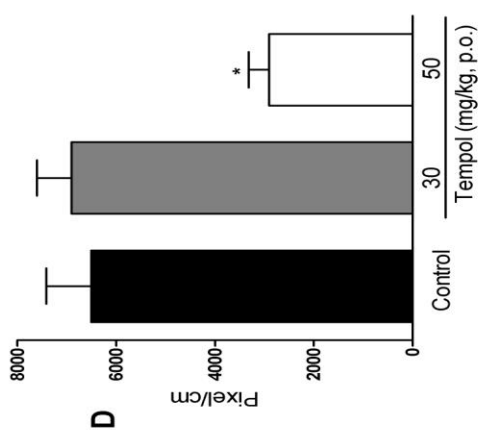


FIGURA 1

Figure 2 – Changes in the total body weight (A and B), and in liver (C) and heart (D) catalase activity in doxorubicin-treated animals. Effects of oral treatment with tempol (50 mg/kg). The columns represent the mean of 5 to 8 experiments and the vertical lines the standard error mean. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, in relation to the control group; # $P < 0.05$, in relation to the doxorubicin-control group.

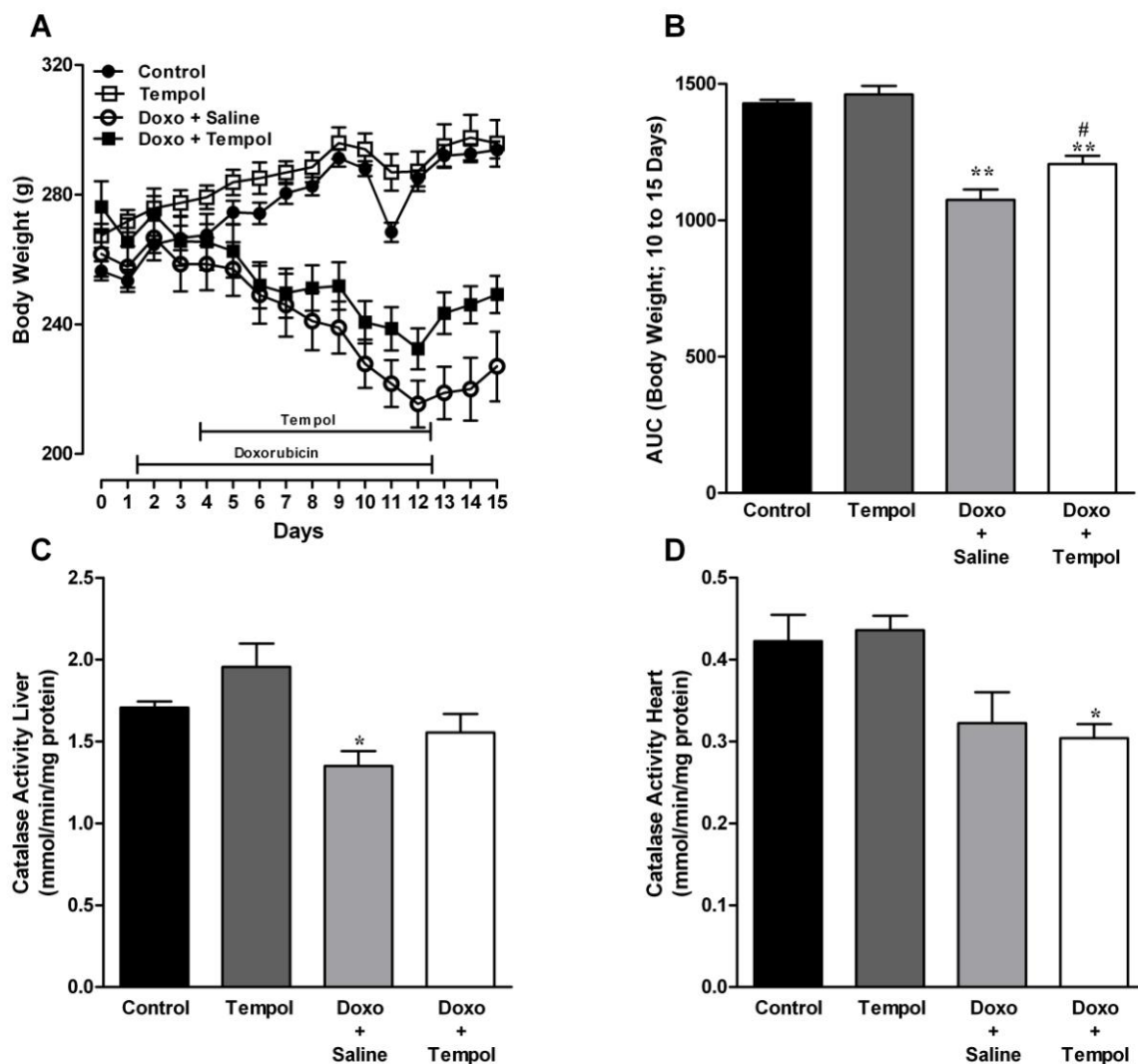


FIGURA 2

Figure 3 – Effects of systemic treatment with tempol (30 and 50 mg/kg; p.o.) on the extent of periapical lesions in doxorubicin-treated rats: radiographic (D) and histological (H) analysis. The columns represent the mean of 5 to 8 experiments and the vertical lines indicate the standard error mean. *P<0.05. (A, B and C) Representative radiographic images of periapical lesions in doxorubicin-control and doxorubicin-tempol groups (30 mg/kg and 50 mg/kg), respectively. (E, F and G) Representative images of histopathological analysis in doxorubicin-control and doxorubicin-tempol groups (30 mg/kg and 50 mg/kg), respectively. (►) Extension of the inflammatory process.

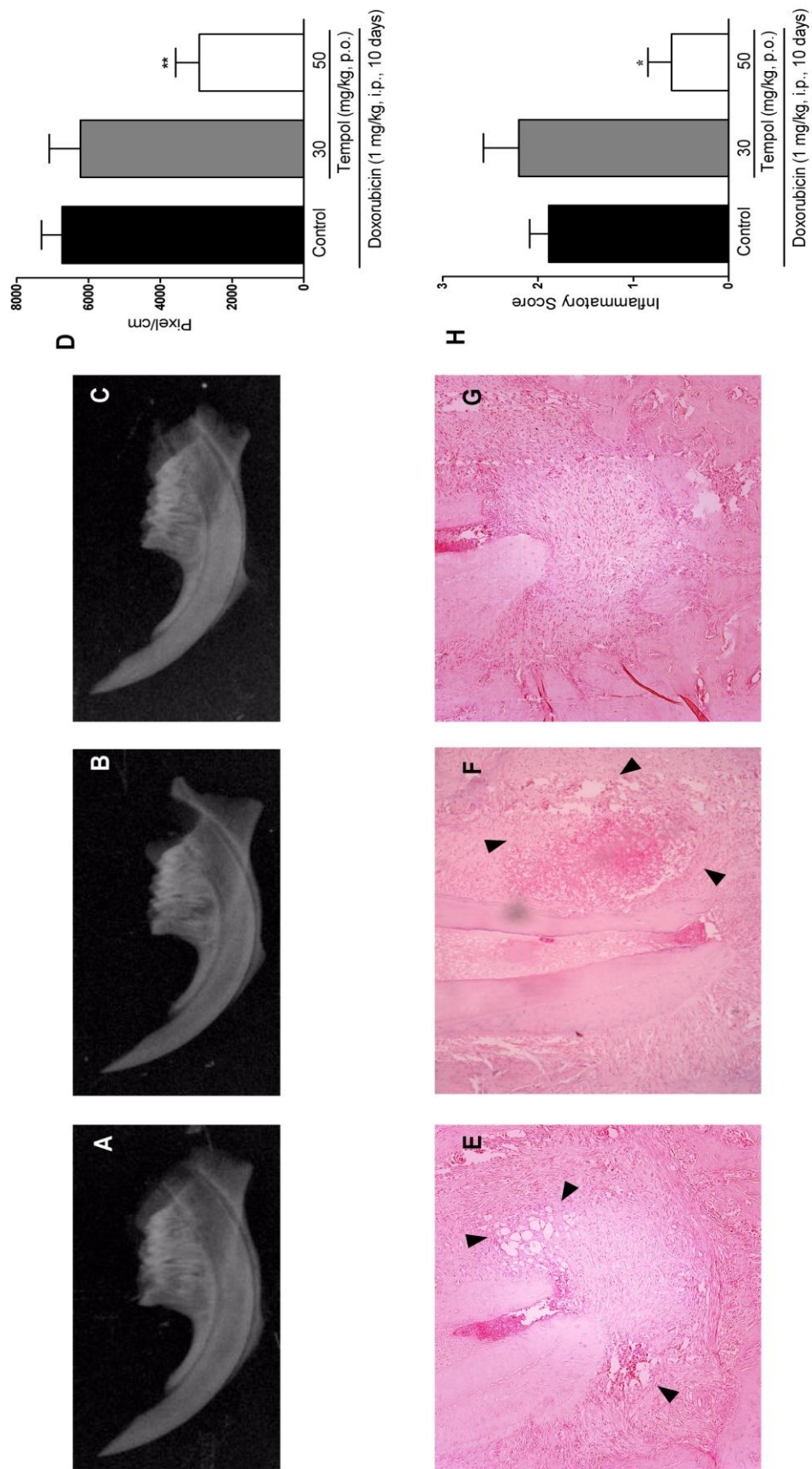


FIGURA 3

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II

ARTIGO 2

Outcome of periapical lesions in a rat model of type-2 diabetes: refractoriness to systemic antioxidant therapy.

Aceito no Periódico Journal of Endodontics, Qualis A1 e Fator de Impacto 2,953 (Anexo B).

Title: Outcome of periapical lesions in a rat model of type-2 diabetes: refractoriness to systemic antioxidant therapy.

Author names and affiliations: Carlos Frederico B. Wolle¹, Luciana A. Zollmann^{2,5}, Patrícia O. Bairros^{3,5}, Adriana Etges⁴, Carlos E. Leite⁵, Fernanda B. Morrone^{2,5}, Maria M. Campos^{1,3,5}.

¹Postgraduate Program of Dental College, PUCRS; ²Faculty of Pharmacy, PUCRS; ³Faculty Dentistry, PUCRS; ⁴Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brazil; ⁵Institute of Toxicology and Pharmacology, PUCRS.

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; E-mail: camposmmartha@yahoo.com; maria.campos@pucrs.br

Acknowledgments

L.A.Z. and P.O.B hold undergraduate grants from the Institutional BPA Program (PUCRS). C.F.W. is a PhD student in Dentistry supported by the Institutional Program ProBolsas. We would like to thank Ms. Silvana Pereira de Souza and Mr. Juliano Soares for their excellent technical assistance. We also kindly thank Mrs. Cristiane Cabral for English revision. The authors deny any conflicts of interest related to this study.

Abstract

Objectives: This study evaluated the development of periapical lesions in a rat model of type-2 diabetes, and assessed the potential actions of the antioxidant agent tempol in this model.

Methods: Male Wistar rats were used; they received tap water (N= 5) or a 20%-glucose solution (N = 15) during nine weeks. At the sixth week, periapical lesions were induced on the first mandibular molars, and the animals were subdivided into four groups. The subgroup (i) was composed by non-diabetic rats orally receiving saline solution (10 ml/kg). Chronically glucose-fed rats were divided into the following subgroups: (ii) saline-treated animals (10 ml/kg, by oral route); animals treated with tempol by gavage (iii) 50 mg/kg; or (iv) 100 mg/kg. The body weight was monitored thoroughly. Following 21 days of apical periodontitis induction, the animals were euthanized, and the mandibles were collected and submitted to radiographic and histological analysis. The livers were collected to determine free radicals and the blood plasma was used to measure insulin levels. **Results:** Type-2 diabetic rats displayed a significant decrease of body weight gain and a slight increase of insulin levels, allied to reduced levels of the antioxidant components catalase and GSH; these alterations were reversed by tempol. Concerning the periapical lesions, neither radiographic nor histological analysis revealed any significant difference between control and type-2 diabetic rats. In diabetic rats, the apical periodontitis was refractory to tempol treatment. **Conclusions:** The extent and cellularity of periapical lesions in glucose-fed type 2 diabetic rats was similar to that seen in control rats. Despite affecting other parameters related to diabetes, tempol failed to improve the outcome of endodontic lesions in type-2 diabetic animals.

Keywords: Insulin-resistance type 2 Diabetes, rats, periapical periodontitis, antioxidant therapy.

Introduction

During the last years, there was a considerable increase in the number of patients with systemic diseases that seek dental care. This condition is especially related to the increased rates in life expectancy, caused by the improvement of health measures and medical care over the last 50 years (1, 2). Of note, some medical conditions, as well as their pharmacological treatments, might directly influence dental treatment (2). Thus, further studies on this regard are still needed.

Type-2 diabetes represents one of the leading causes of death worldwide, especially in developed countries. It is characterized by complex metabolic disorders mainly related to insulin resistance in liver and muscles (3). Diabetic patients display a series of alterations, such as angiopathy, hypertension, atherosclerosis, stroke, and marked changes of vascular permeability. Diabetes can also disrupt neutrophil functions, kidneys (nephropathy), eyes (retinopathy) and the nervous system (neuropathy), besides reducing collagen synthesis and maturation (4-9).

Regarding the oral health, diabetes can cause major alterations of the oral tissues, presenting a broad variety of manifestations such as dry mouth, loss of taste sensation to sweet, and sialosis. It can also alter the progression of diseases such as caries, periodontitis, lesions of soft tissues, and the patients are prone to bacterial and fungal infections. Furthermore, diabetes has been pointed out as a complicating factor of endodontic infections, impairing the healing of periapical lesions, especially when the disease is poorly controlled (3, 5, 10-13). Noteworthy, recent evidence suggests a link between diabetes and chronic periodontal disease (14), failure of endodontic treatment (15), increased prevalence of apical periodontitis (16), and increased loss of endodontically-treated teeth (17).

Several reasons might account for the oral manifestations related to diabetes, such as the decrease in cellular antioxidant defense systems. In fact, it is well known that diabetic

state is associated with increased oxidative stress, and hyperglycemia further stimulates the production of advanced glycosylated end products (7) . Notably, it has been demonstrated that antioxidant drugs can improve several complications allied to type-2 diabetes, such as neuropathic states (18). Therefore, this study aimed to evaluate the development of periapical lesions in a rat model of type-2 diabetes induced by chronic ingestion of glucose 20%. Furthermore, we have also assessed whether the treatment with the antioxidant agent tempol might influence periapical lesions in this experimental model.

Material and Methods

Animals

All animal procedures were performed according with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by National Institutes for Health (NIH). The methodology was approved by the local animal ethics committee (CEUA) of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA-PUCRS, Brazil). In this study, 20 male Wistar rats (weighting 100 to 140 g at the beginning of the experiments) were used. They were housed under controlled conditions (temperature: 22 ± 1 °C, 70% humidity, and a 12h/12h light-dark cycle) and received a standard rat chow diet (Nuvilab®), with free access to filtered water or 20 % glucose solution, depending on the experimental group.

Induction of insulin resistant type-2 diabetes

This model was accomplished as described previously, with some modifications (18). Briefly, the rats received 20 % D-glucose in the drinking water during a total period of 9 weeks (N = 15). Control animals received filtered water during the same period (N = 5). After six weeks of glucose administration onset, periapical lesions were induced on the first

mandibular molars as described below. The body weight gain was registered during the last three weeks.

Periapical lesion induction

Periapical lesion induction was performed as previously described, with minor adaptations (19). Rats were anesthetized by i.p. injection of an association of xylazine (10 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg). The pulps of the mandibular first molars on both sides were surgically exposed with a ¼ size round steel bur in high-speed rotation, under constant irrigation. Pulp were left open to the oral cavity for three weeks (21 days) in order to allow periapical lesion establishment.

Protocols of treatment with tempol

After inducing periapical lesions, the animals continued to receive 20% D-glucose or tap water, and four experimental groups were formed. The group (i) was composed by five non-diabetic rats orally receiving saline solution (10 ml/kg). Glucose-fed insulin resistant rats were additionally divided into the following groups, composed by five rats each: (ii) saline solution-treated animals (10 ml/kg); animals treated with tempol by gavage at doses of (iii) 50 mg/kg, or (iv) 100 mg/kg. Tempol was administered during three weeks, once a day. The doses of tempol were selected on the basis of previous publications (19-21).

Measurement of plasma insulin

Following 21 days of periapical lesion induction, the animals were euthanized by deep anesthesia with isoflurane. The blood was rapidly collected by heart puncture and immediately transferred into a chilled tube of 6 ml. The plasma was obtained by centrifugation and kept refrigerated for the later measurement of insulin by radioimmunoassay (Siemens, Los Angeles – USA) using 100 µl of plasma (18).

Radiographic analysis

Radiographs were taken in order to form a perpendicular angle with the vestibular surface of the first molars on both right and left sides. A Kodak digital sensor (Eastman Kodak Co, Rochester, USA) was used. The x-ray unit (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brazil) was operated at 60 kVp, 7 mA, with an exposure time of 0.2 s and a focal distance of 30 cm. Image analysis was performed using the software Adobe Photoshop 11.0 (Adobe Systems Incorporated®, SanJose, CA) by an examiner blinded to the experimental groups, as previously described (19, 22). In this study, left and right lesions of each rat were measured, and the values were summed and divided by two, being considered as a duplicate. The values were provided as the mean area of each experimental group in pixels/cm.

Histopathological analysis

After euthanasia, the mandibles were surgically removed, dissected, and fixed in 10% neutral-buffered formalin solution. The specimens were processed at the Laboratory of Histopathology (School of Dentistry, UFPEL). The samples were decalcified with 5% nitric acid (pH 7.4), which was renewed every 2 days. For the histopathological analysis, the methodology described before (22) was accomplished. Briefly, paraffin blocks containing the mandibles were serially sectioned with average thickness of 6 μm in a mesio-distal plane. Sections were stained with hematoxylin and eosin, and examined under light microscopy (200 X magnification). Two histological slides (four fields in each) were evaluated for every tooth, which included the root dentin, the apical foramen and the periapical tissues. The intensity of inflammatory infiltrate was classified according to the following scores: 0, absent; 1, discrete; 2, moderate; or 3, severe (19, 23) by a pathologist blind to the experimental groups (24).

Oxidative stress

To further confirm the establishment of insulin-resistance type-2 diabetes model, after euthanasia, the livers were immediately collected and submitted to biochemical analysis to determine catalase and reduced glutathione (GSH) activities, two classical indicators of tissue oxidative stress (25).

Statistical Analysis

The results are expressed as the mean \pm the standard error mean of 5 animals in each experimental group. The sample size was established on the basis of previous literature studies (19) and by using the statistical program GraphPad InStat® (GraphPad Software In, San Diego, CA). Data was subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's *post-hoc* test. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Insulin resistance type-2 diabetes model: effects of tempol

The animals submitted to chronic intake of 20%-glucose solution displayed a significant reduction in the percentage of body weight gain when compared to control group. Of note, this effect was reversed by the oral treatment with the antioxidant agent tempol, at the dose of 100 mg/kg. Otherwise, the treatment with tempol 50 mg/kg was not able to prevent the reduction of body mass gain (Figure 1A). Type-2 diabetic rats showed a slight increase of insulin plasma levels, and the administration of tempol resulted in a marked reduction of this parameter (50 and 100 mg/kg; Figure 1B). Interestingly, type-2 diabetic rats presented a significant diminishment of catalase (Figure 1C) and GSH levels (Figure 1D), according to evaluation of liver samples. Of note, the levels of catalase were restored by the treatment with tempol (100 mg/kg), in a significant manner.

Radiographic Analysis

As it can be observed in the Figure 2A, there was no significant difference in the areas of periapical lesions under radiographic analysis, when comparing control and type-2 diabetic rats. Nevertheless, the repeated oral treatment with tempol failed to significantly alter the lesion extension, at either tested doses (50 and 100 mg/kg). Representative images of the four experimental groups are provided from Figure 2B to 2E.

Histological Evaluation

Extending radiographic data, the histological analysis did not reveal any significant difference among the experimental groups, according to assessment of the inflammatory scores (Figure 3A). The representative histological images (from 2B to 2E) demonstrate that moderate inflammatory infiltrate, composed mainly by neutrophils and to a lesser extent by lymphocytes, was present in the four experimental groups, without clear differences between control and type-2 diabetic rats, or even in animals treated with tempol (50 and 100 mg/kg).

Discussion

The present study was designed to evaluate the development of periapical lesions in a model of type-2 diabetes in rats, as well as, to assess the effectiveness of systemic treatment with the antioxidant agent tempol on that condition. In our study, rats submitted to administration of 20%-glucose solution for 9 weeks displayed a significant reduction of body weight gain, which was allied to a subtle increase of insulin levels. Furthermore, we observed a significant reduction of both catalase and GSH levels in liver samples, indicating the occurrence of oxidative stress. Similar alterations have been reported beforehand, in a series of previous studies using the same experimental protocol (18, 26-28) confirming the reproducibility of the type-2 diabetes model.

We questioned whether these alterations might also affect the size of endodontic periapical lesions. Surprisingly, our data demonstrated that extension of periapical lesions in type-2 diabetic rats was similar to that seen in control non-diabetic animals, according to either radiographic or histological evaluation. Concerning the literature data, most studies have employed insulin-dependent type-1 diabetes models, and indicated a marked increase in the severity of periapical disease in diabetic rats (23, 29, 30). However, it is important to consider that type-2 diabetes accounts for about 90% of all diabetes cases (31), justifying further investigations on this subject. In fact, a previous study conducted by Iwama et al.(22) demonstrated the absence of differences in periapical lesions, when comparing control rats to animals submitted to high glucose intake during 4 weeks. In another publication, Hamman et al. (27) showed that Zucker type-2 diabetic fatty rats presented reduced bone mass and impaired bone regeneration, while the bone matrix mineralization remained unaffected, what might help to explain our data. In addition, a recent clinical study conducted by Marotta et al.(32) indicates that although patients with type-2 diabetes can be more prone to develop apical periodontitis, this systemic condition does not affect the prevalence of periapical lesions in root canal–treated teeth, or even the number of treated teeth per individual.

It is tempting to surmise that type-1 and type-2 diabetes might affect apical periodontitis in a distinct manner. On this regard, it was previously shown that bone mineral density is reduced in type-1 diabetic patients, whereas this parameter is found normal or slightly increased in type-2 diabetes (33, 34). Of note, clinical evidence indicates that type 1 and type-2 diabetes can differently affect the severity of periodontal diseases and tooth loss (35). Concerning data presented herein, it is feasible to infer that type-2 diabetes is not related to marked changes of the extent of periapical lesions. One might suggest that it would be possible to detect significant differences of periapical lesions in our study by using a higher sample size. However, we carried out an independent series of experiments, using the same

division of groups, with 5 rats in each, and the results were quite analogous concerning the lesion areas, according to radiographical assessment (results not shown).

In this study, we have also evaluated the possible effects of tempol in our experimental paradigm. Of note, the administration of tempol (100 mg/kg) was able to significantly prevent the loss of body weight gain observed in diabetic animals. Furthermore, tempol administration reversed significantly the reduced liver levels of catalase, and diminished the insulin plasma levels in diabetic rats. Nonetheless, both doses of tempol failed to significantly affect the extent of periapical lesions in type-2 diabetic rats, as indicated by the radiographic evaluation. In addition, the systemic treatment with tempol did not significantly change the inflammatory scores in the histological evaluation, in either tested doses. Hence, in spite of interfering with some important indicatives of disease activity, the treatment with tempol was not able to alter the radiographic extent or the cellularity of periapical lesions, in type-2 diabetic rats. Of note, other studies reported the effectiveness of similar doses of tempol in attenuating vascular, renal and cardiac alterations in diabetes (36, 37), as well as in reducing the intensity of tissue damage in animal models of local and systemic inflammation (38, 39). Moreover, a recent study conducted by us (19) demonstrated the beneficial effects of tempol on apical periodontitis in either control animals or in rats with doxorubicin-elicited cardiomyopathy, when tested at the dose of 50 mg/kg. The administration of tempol was also effective in reducing by 70 % the plasma levels of insulin in obese Zucker rats, corroborating our results (36).

When analyzed in concert with literature data, our results suggest refractoriness to systemic antioxidant therapy of periapical lesions in type-2 diabetes. It is important to consider that some pieces of clinical evidence convincingly point out type-2 diabetes as a complicating factor to endodontic treatment (40), and this might be related to several reasons, including changes of microbiota (41) and increased levels of vascular endothelial growth

factor (VEGF) and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in type-2 diabetic patients (42). Furthermore, the limited effects of tempol in our experimental model could be associated to the reduced vascularization of bone tissues, secondary to changes in large and small circulation during diabetes, although this remains to be further investigated (8). We might also suggest that tempol might display increased effectiveness if associated to an oral anti-diabetic drug such as metformin, or used directly into the root canal, as a temporary dressing. In this context, an interesting recent study demonstrated that metformin administration reduced the number of osteoclasts and inhibited the alveolar bone resorption in a model of periapical lesions in normal rats (43).

In conclusion, although we did not detect any significant difference in the extent of periapical lesions in chronically glucose-fed rats, when compared to control animals, it seems likely reasonable to suggest that periapical lesions of type-2 diabetic rats are quite refractory to systemic antioxidant therapy. These pieces of evidence reinforce the idea that endodontic treatment of diabetic patients can represent an intricate task in clinical set, and therefore novel strategies must be developed to manage these complications.

Figure 1

Percentage of body weight gain (A), plasma insulin levels (B), catalase (C), and GSH (D) liver levels in animals submitted to chronic intake of 20%- glucose solution. Effects of oral treatment with tempol (50 and 100 mg/kg). Columns represent the mean of 5 experiments, and vertical lines indicate the standard error of mean. *[#]P<0.05; **^{##}P<0.01.

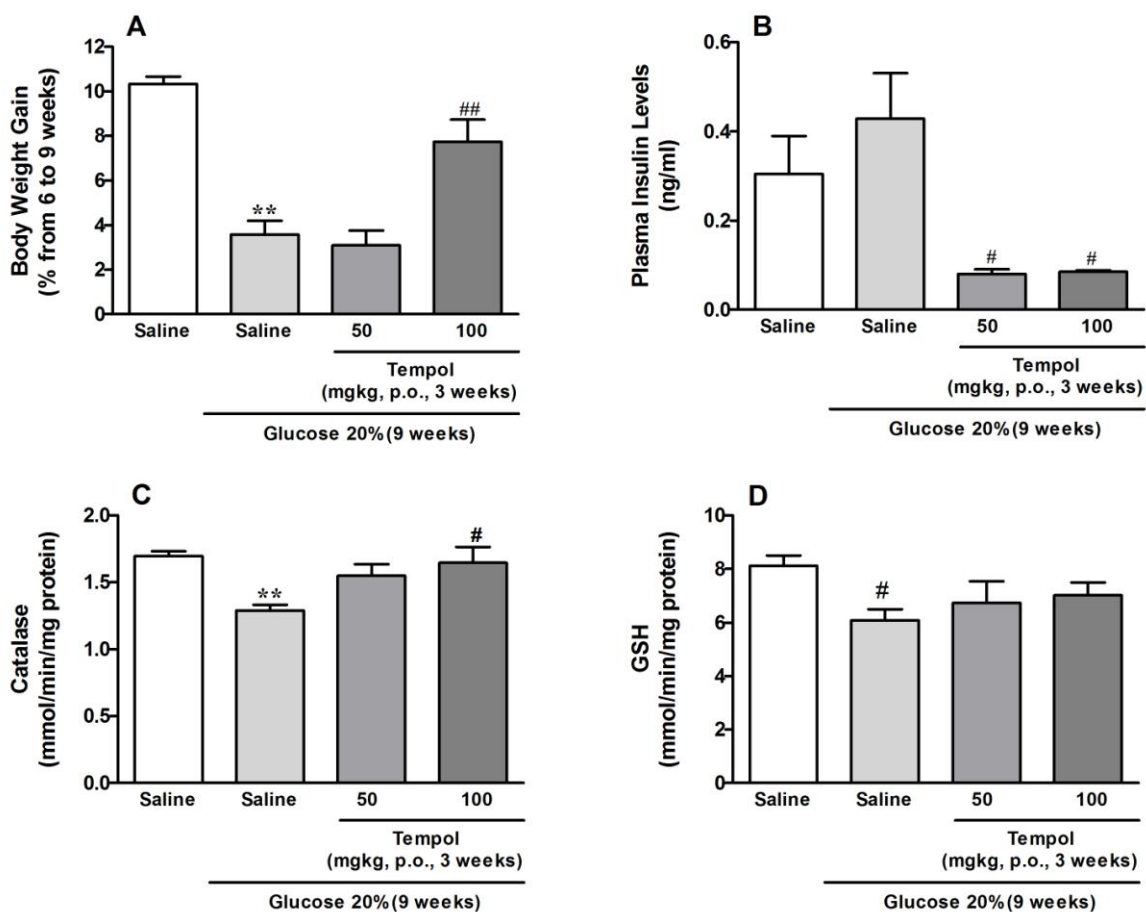
**FIGURA 1**

Figure 2

Extension of the radiographic area of periapical lesions (A). Columns represent the mean of 5 animals (in duplicate), and vertical lines indicate the standard error of mean. Representative radiographic images of periapical lesions in control animals (B) or in glucose-fed rats (C). Effects of treatment with the antioxidant tempol at 50 (D) and 100 (E) mg/kg, respectively. (▶) Radiolucid areas indicating periapical lesions.

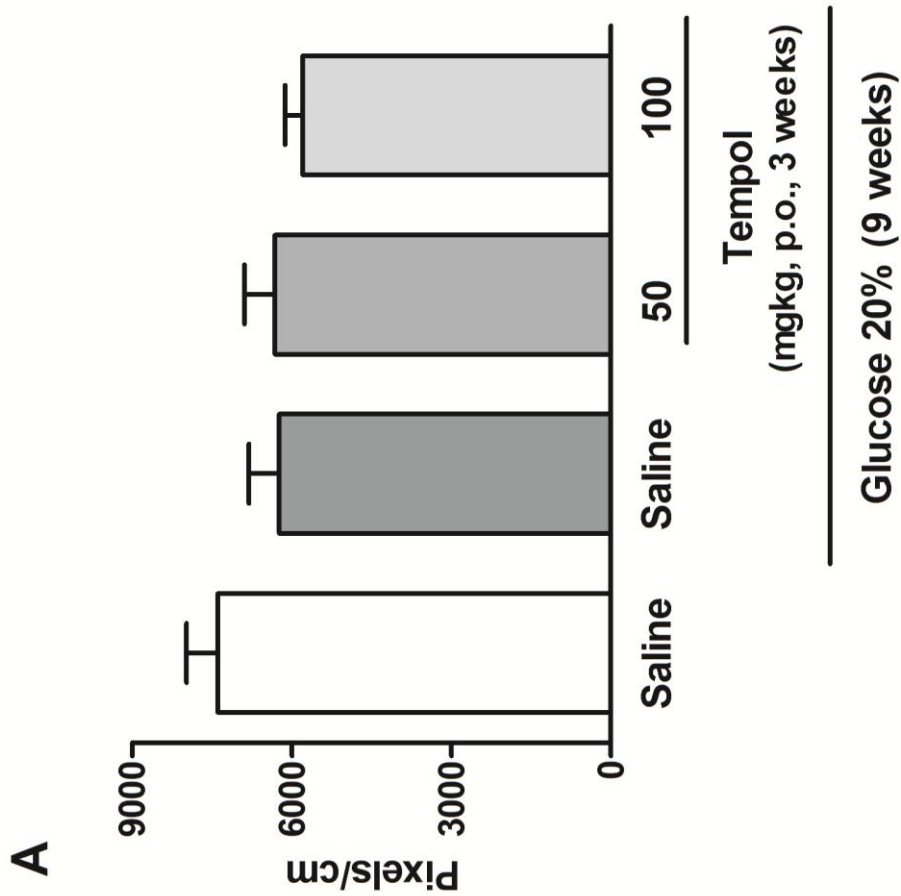
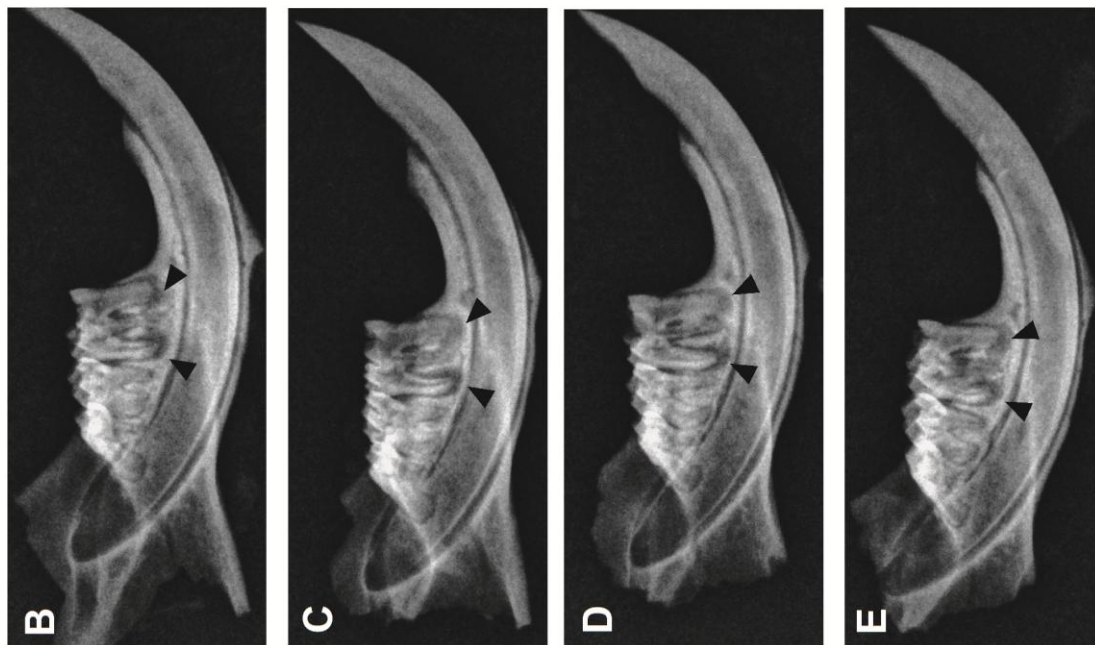


FIGURA 2

Figure 3

Histological scores of periapical lesions (A). Columns represent the mean of 5 animals (in duplicate), and vertical lines indicate the standard error of mean. Representative histological images of periapical lesions in control animals (B), or in glucose-fed rats (C). Effects of treatment with the antioxidant tempol at 50 (D) and 100 (E) mg/kg, respectively. (▶) Extension of the inflammatory process.

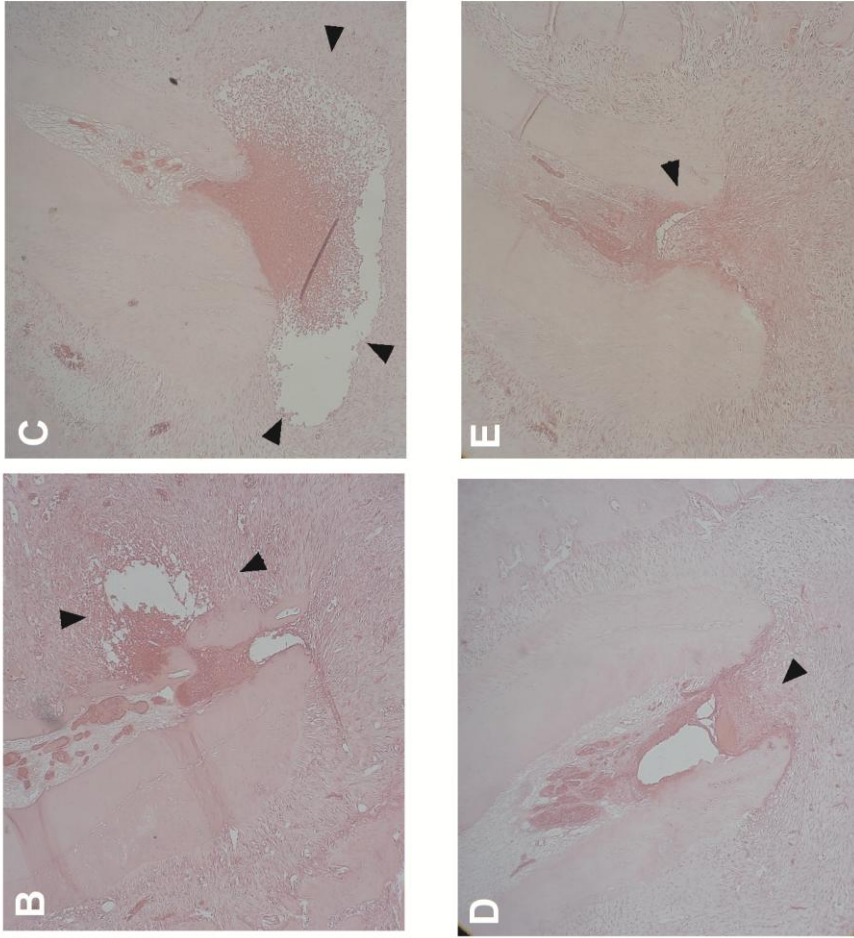
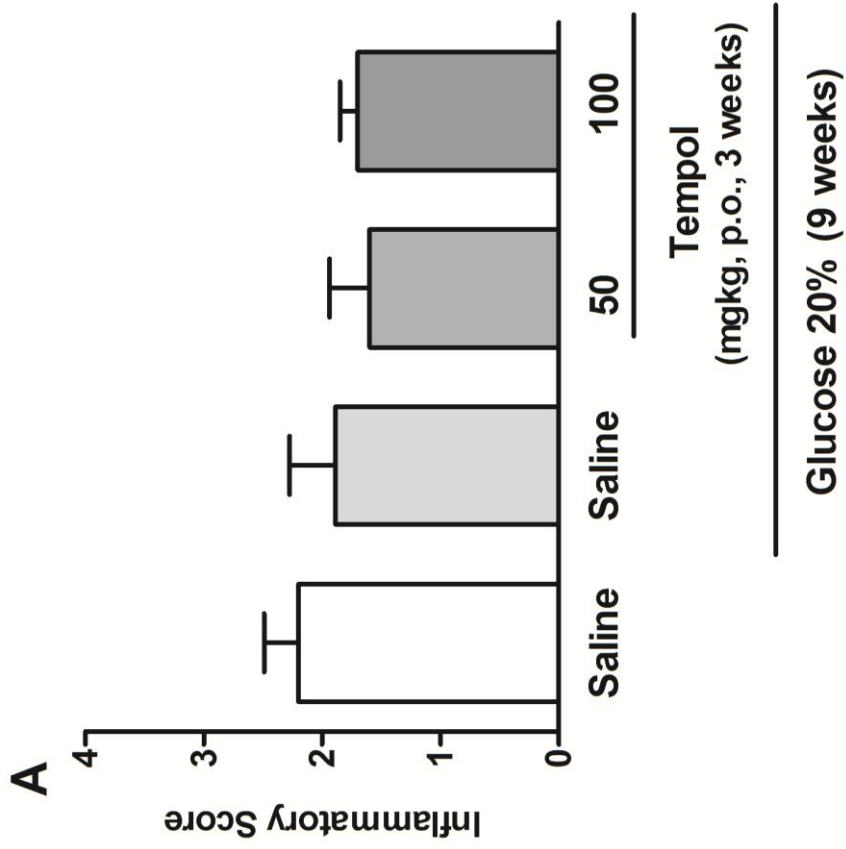


FIGURA 3

References

1. Kelly M SJ, Nuttall N, Bradbock G, Morris J, Nunn J, Pine C, Pitts N, Treasure E, White D. Adult Dental Health Survey Oral Health in the United Kingdom 1988. 1988.
2. Seymour RA. Dentistry and the medically compromised patient. *Surgeon*. 2003 Aug;1(4):207-14.
3. Manfredi M, McCullough MJ, Vescovi P, Al-Kaarawi ZM, Porter SR. Update on diabetes mellitus and related oral diseases. *Oral Dis*. 2004 Jul;10(4):187-200.
4. Kidambi S, Patel SB. Diabetes mellitus: considerations for dentistry. *J Am Dent Assoc*. 2008 Oct;139 Suppl:8S-18S.
5. Lamster IB, Lalla E, Borgnakke WS, Taylor GW. The relationship between oral health and diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc*. 2008 Oct;139 Suppl:19S-24S.
6. Calcutt NA, Cooper ME, Kern TS, Schmidt AM. Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 May;8(5):417-29.
7. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev*. 2004 Aug;25(4):612-28.
8. Feng L, Matsumoto C, Schwartz A, Schmidt AM, Stern DM, Pile-Spellman J. Chronic vascular inflammation in patients with type 2 diabetes: endothelial biopsy and RT-PCR analysis. *Diabetes Care*. 2005 Feb;28(2):379-84.
9. Deshpande AD, Harris-Hayes M, Schootman M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther*. 2008 Nov;88(11):1254-64.
10. Miley DD, Terezhalmay GT. The patient with diabetes mellitus: etiology, epidemiology, principles of medical management, oral disease burden, and principles of dental management. *Quintessence Int*. 2005 Nov-Dec;36(10):779-95.
11. Bender IB, Bender AB. Diabetes mellitus and the dental pulp. *J Endod*. 2003 Jun;29(6):383-9.
12. Leite MF, Ganzerla E, Marques MM, Nicolau J. Diabetes induces metabolic alterations in dental pulp. *J Endod*. 2008 Oct;34(10):1211-4.
13. Lalla RV, D'Ambrosio JA. Dental management considerations for the patient with diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc*. 2001 Oct;132(10):1425-32.
14. Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. *Ann Periodontol*. 1998 Jul;3(1):51-61.
15. Wang CH, Chueh LH, Chen SC, Feng YC, Hsiao CK, Chiang CP. Impact of diabetes mellitus, hypertension, and coronary artery disease on tooth extraction after nonsurgical endodontic treatment. *J Endod*. 2011 Jan;37(1):1-5.
16. Lopez-Lopez J, Jane-Salas E, Estrugo-Devesa A, Velasco-Ortega E, Martin-Gonzalez J, Segura-Egea JJ. Periapical and endodontic status of type 2 diabetic patients in Catalonia, Spain: a cross-sectional study. *J Endod*. 2011 May;37(5):598-601.
17. Mindiola MJ, Mickel AK, Sami C, Jones JJ, Lalumandier JA, Nelson SS. Endodontic treatment in an American Indian population: a 10-year retrospective study. *J Endod*. 2006 Sep;32(9):828-32.
18. Dias JP, Talbot S, Senecal J, Carayon P, Couture R. Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. *PLoS One*. 2010;5(9):e12622.
19. 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*. 2011 Feb;38(2):191-5.

20. Nassar T, Kadery B, Lotan C, Da'as N, Kleinman Y, Haj-Yehia A. Effects of the superoxide dismutase-mimetic compound tempol on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2002 Feb 1;436(1-2):111-8.
21. Soule BP, Hyodo F, Matsumoto K, Simone NL, Cook JA, Krishna MC, et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radic Biol Med.* 2007 Jun 1;42(11):1632-50.
22. Iwama A, Nishigaki N, Nakamura K, Imaizumi I, Shibata N, Yamasaki M, et al. The effect of high sugar intake on the development of periradicular lesions in rats with type 2 diabetes. *J Dent Res.* 2003 Apr;82(4):322-5.
23. Armada-Dias L, Breda J, Provenzano JC, Breitenbach M, Rocas IN, Gahyva SM, et al. Development of periradicular lesions in normal and diabetic rats. *J Appl Oral Sci.* 2006 Oct;14(5):371-5.
24. Bergoli RD, Chagas Junior OL, de Souza CE, Vogt BF, de Oliveira HT, Etges A, et al. Isotretinoin effect on alveolar repair after exodontia: a study in rats. *Oral Maxillofac Surg.* 2011 Jun;15(2):85-92.
25. Leite MF, De Lima A, Massuyama MM, Otton R. In vivo astaxanthin treatment partially prevents antioxidant alterations in dental pulp from alloxan-induced diabetic rats. *Int Endod J.* 2010 Nov;43(11):959-67.
26. Ismael MA, Talbot S, Carbonneau CL, Beausejour CM, Couture R. Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetyl-L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. *Eur J Pharmacol.* 2008 Jul 28;589(1-3):66-72.
27. Hamann C, Goettsch C, Mettelsiefen J, Henkenjohann V, Rauner M, Hempel U, et al. Delayed bone regeneration and low bone mass in a rat model of insulin-resistant type 2 diabetes mellitus is due to impaired osteoblast function. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;301(6):E1220-8.
28. Sheludiakova A, Rooney K, Boakes RA. Metabolic and behavioural effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat. *Eur J Nutr.* 2012 Jun;51(4):445-54.
29. Kohsaka T, Kumazawa M, Yamasaki M, Nakamura H. Periapical lesions in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Endod.* 1996 Aug;22(8):418-21.
30. Garber SE, Shabahang S, Escher AP, Torabinejad M. The effect of hyperglycemia on pulpal healing in rats. *J Endod.* 2009 Jan;35(1):60-2.
31. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004;27(Suppl 1):s5-s10.
32. Marotta PS, Fontes TV, Armada L, Lima KC, Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Type 2 diabetes mellitus and the prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment in an adult Brazilian population. *J Endod.* 2012 Mar;38(3):297-300.
33. van Daele PL, Stolk RP, Burger H, Algra D, Grobbee DE, Hofman A, et al. Bone density in non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Rotterdam Study. *Ann Intern Med.* 1995 Mar 15;122(6):409-14.
34. Tuominen JT, Impivaara O, Puukka P, Ronnema T. Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 1999 Jul;22(7):1196-200.
35. Kaur G, Holtfreter B, Rathmann W, Schwahn C, Wallaschofski H, Schipf S, et al. Association between type 1 and type 2 diabetes with periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol.* 2009 Sep;36(9):765-74.
36. Banday AA, Marwaha A, Tallam LS, Lokhandwala MF. Tempol reduces oxidative stress, improves insulin sensitivity, decreases renal dopamine D1 receptor hyperphosphorylation, and restores D1 receptor-G-protein coupling and function in obese Zucker rats. *Diabetes.* 2005 Jul;54(7):2219-26.
37. Wilcox CS. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol Ther.* 2010 May;126(2):119-45.

38. Di Paola R, Mazzon E, Zito D, Maiere D, Britti D, Genovese T, et al. Effects of Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005 Oct;32(10):1062-8.
39. Sledzinski Z, Wozniak M, Antosiewicz J, Lezoche E, Familiari M, Bertoli E, et al. Protective effect of 4-hydroxy-TEMPO, a low molecular weight superoxide dismutase mimic, on free radical toxicity in experimental pancreatitis. *Int J Pancreatol*. 1995 Oct;18(2):153-60.
40. Britto LR, Katz J, Guelmann M, Heft M. Periradicular radiographic assessment in diabetic and control individuals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Oct;96(4):449-52.
41. Iwama A, Morimoto T, Tsuji M, Nakamura K, Higuchi N, Imaizumi I, et al. Increased number of anaerobic bacteria in the infected root canal in type 2 diabetic rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 May;101(5):681-6.
42. Ilic J, Radovic K, Roganovic J, Brkovic B, Stojic D. The levels of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein 2 in dental pulp tissue of healthy and diabetic patients. *J Endod*. 2012 Jun;38(6):764-8.
43. Liu L, Zhang C, Hu Y, Peng B. Protective effect of metformin on periapical lesions in rats by decreasing the ratio of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin. *J Endod*. 2012 Jul;38(7):943-7.

DISCUSSÃO GERAL

DISCUSSÃO GERAL

A endodontia presenciou, nas últimas décadas, uma grande evolução técnica e científica, que possibilitou o desenvolvimento de novos materiais e a confecção de instrumentos com melhores propriedades físicas. O avanço científico permitiu a elaboração de novas metodologias associadas a princípios éticos e biológicos, garantindo procedimentos baseados em evidências científicas, mais conservadores e menos agressivos.

Apesar disso, a ocorrência de insucessos endodônticos, que não estão relacionados diretamente com a técnica aplicada, ainda está presente na prática clínica. Algumas intercorrências estão associadas a problemas sistêmicos apresentados pelos pacientes; esses podem interferir de forma significativa no sucesso do tratamento endodôntico.

A literatura relata que as alterações sistêmicas presentes em pacientes diabéticos e cardiopatas estão relacionadas à formação de radicais livres, prejudicando o metabolismo e as defesas do organismo, o que dificulta consideravelmente o processo de reparo. Os mecanismos pelos quais as desordens metabólicas podem influenciar na progressão e no reparo de lesões endodônticas ainda não estão bem esclarecidos.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito destas alterações sobre lesões periapicais em ratos portadores de cardiomiopatia e diabetes do tipo 2, bem como, analisar o efeito do tratamento com o antioxidante tempol nestes processos.

Com base nos resultados obtidos nos exames radiográficos e nas análises histológicas, foi possível observar que o tempol, na dose de 50 mg/kg, foi capaz de prevenir o desenvolvimento de periodontite apical, tanto em ratos cardiopatas, como em animais controle. Entretanto, a dose de 30 mg/kg não foi efetiva em alterar significativamente ambos os parâmetros, radiográficos ou histológicos, permitindo sugerir um efeito dose-dependente para o tempol. Além disso, outros estudos (34) mostraram que a administração oral de tempol em ratos, foi capaz de inibir significativamente a doença periodontal induzida por ligadura.

A administração de doxorrubicina provocou diminuição na atividade da catalase no fígado e no coração, indicando o excesso na produção de radicais livres, induzido pela droga. O tratamento com tempol (50 mg/kg) melhorou de forma geral os sinais relacionados com a cardiomiopatia, como perda de peso corporal e déficits da coordenação motora. Entretanto, o tratamento com tempol não reverteu a diminuição da atividade da catalase, apesar de haver uma tendência a um efeito protetor. Nesse caso, é possível inferir que doses mais elevadas de tempol ou, um tempo maior de tratamento, poderiam apresentar efeitos mais expressivos.

Os dados obtidos neste estudo mostram, pela primeira vez, os efeitos sistêmicos benéficos do antioxidante tempol na periodontite apical de animais controle e em ratos com cardiomiopatia induzida por doxorrubicina. Sua efetividade pode estar relacionada ao fato do tempol ser uma molécula com baixo peso molecular e solúvel em água, o que facilitaria sua permeabilidade ao longo das membranas biológicas, inclusive alcançando os espaços periapicais (37). Esse dado é bastante interessante, considerando que normalmente fármacos antibióticos administrados por via sistêmica apresentam efetividade limitada na resolução de lesões periapicais. Pode-se sugerir que a terapia com o tempol poderia representar uma estratégia coadjuvante útil em pacientes com doenças cardiovasculares, que precisam ser submetidos a terapias endodônticas. Em relação a isso, as características farmacocinéticas favoráveis do tempol poderiam representar uma vantagem adicional na prática clínica.

Estudos utilizando substâncias com propriedades antioxidantes, como o chá verde e a metformina (29, 38), quando empregadas sistemicamente em modelos semelhantes de periodontite apical, produziram resultados animadores, no que se refere à redução do tamanho de lesões periapicais. Entretanto, nestes estudos, não existia a associação de doenças crônicas como a cardiomiopatia e o diabetes, como avaliado no presente trabalho. Por isso, o presente estudo também investigou se a administração sistêmica do tempol poderia ser eficaz na prevenção do estabelecimento de periodontite apical, em um modelo de diabetes do tipo 2 em

ratos. Os animais submetidos à administração de solução de glicose 20%, durante 9 semanas, apresentaram uma redução significativa do ganho de peso corporal, aliada a um aumento nos níveis de insulina, refletindo o estado de resistência à insulina. Além disso, nas amostras de fígado, foi observada uma redução nos níveis de catalase e GSH, indicando a ocorrência de estresse oxidativo. Alterações similares foram reportadas em uma série de estudos anteriores, utilizando o mesmo protocolo experimental (19, 28, 39, 40), confirmando a reprodutibilidade do modelo de diabetes tipo 2.

Após a avaliação radiográfica e histológica, foi observado que a extensão das lesões periapicais em ratos diabéticos tipo 2 foi semelhante ao encontrado nos animais não diabéticos. Os dados da literatura, geralmente utilizam modelos de diabetes tipo 1 e, indicam um aumento marcante na severidade da doença periapical em ratos diabéticos (41-43). Entretanto, é importante considerar que a diabetes tipo 2 ocorre em cerca de 90% de todos os casos de diabetes (44), justificando investigações adicionais sobre este assunto. Em um estudo anterior, realizado por Iwama et al 2003 (26), foi demonstrada a ausência de diferenças nos tamanhos das lesões periapicias, quando foram comparados ratos controle e animais submetidos à ingestão de altos teores de glicose, durante 4 semanas. Apesar das diferenças entre os dois modelos experimentais (adotamos um tratamento com glicose de longa duração), é possível inferir que o diabetes tipo 2 não está relacionado com alterações acentuadas da extensão das lesões periapicais. Além disso, é possível inferir que o diabetes tipo 1 e tipo 2 poderiam afetar de forma diferente o desenvolvimento da periodontite apical, pelo menos em modelos em roedores.

A administração do tempol (100 mg/kg) foi capaz de reduzir significativamente a perda de ganho de peso, observada nos animais diabéticos, além de reverter a redução dos níveis hepáticos de catalase e GSH, restaurando os níveis plasmáticos de insulina. No entanto, esse mesmo tratamento não alterou a extensão das lesões periapicais em ratos com diabetes

tipo 2, como indicado pelos exames radiográficos. Além disso, o tratamento sistêmico com tempol não modificou, significativamente, os escores inflamatórios na avaliação histológica. Deste modo, apesar de atuar em alguns indicadores importantes da atividade da doença, o tratamento com tempol não produziu alterações da extensão e da celularidade das lesões periapicais, em ratos com diabetes tipo 2. É importante observar que outros estudos relataram efeitos benéficos das mesmas doses de tempol sobre alterações vasculares, renais e cardíacas em ratos diabéticos (32, 33), bem como, na redução da intensidade do dano tecidual em modelos animais de inflamação local e sistêmica (34, 35).

Quando analisados em conjunto com os dados da literatura, os resultados obtidos neste estudo permitem sugerir que o diabetes do tipo 2 parece representar um fator complicador para o tratamento de lesões periapicais, o que é suportado por evidências clínicas (23). A ausência de efeitos do tempol nesse modelo poderia estar relacionada a vários fatores, incluindo alterações na microbiota (45). Deve-se considerar que o tempol poderia exibir maior eficácia, se associado a um medicamento anti-diabético oral, como a metformina ou, se utilizado como medicação intracanal. Neste contexto, um interessante estudo, demonstrou que a administração de metformina reduziu o número de osteoclastos e inibiu a reabsorção óssea alveolar em um modelo de lesão periapical em ratos normais (29).

Coletivamente, os dados apresentados neste estudo ajudam a entender melhor as razões pelas quais o tratamento endodôntico de pacientes diabéticos pode representar uma tarefa complexa na prática clínica. Parece razoável sugerir que as lesões periapicais são refratárias à terapia antioxidante sistêmica durante o diabetes e, portanto, novas estratégias devem ser desenvolvidas para gerenciar esta complicação.

Nas pesquisas em Odontologia existe uma grande dificuldade em encontrar artigos científicos que abordem a influência de desordens sistêmicas no sucesso ou fracasso do tratamento. O contrário também é verdadeiro, ou seja, são poucos os trabalhos que associam

os efeitos de procedimentos locais na saúde geral do paciente. Na maioria dos casos, são identificados estudos que realizam infinitas comparações entre protocolos e técnicas, ou ainda, trabalhos que são verdadeiros testes de qualidade dos produtos que a indústria lança. Quando os estudos são concluídos e se chega a algum resultado, este produto simplesmente já foi substituído por um novo lançamento. Precisamos direcionar nossos esforços para pesquisas que contemplem o desenvolvimento de novos materiais e novas medicações, mas também é necessário desenvolver estudos que avaliem o organismo como um todo, seus efeitos locais e as consequências sistêmicas dos materiais, técnicas e tratamentos utilizados, para que se possa realmente fazer procedimentos baseados em evidências científicas. Nesse sentido, espera-se que o conjunto de resultados do presente estudo possa contribuir para o desenvolvimento de estratégias futuras para o tratamento de alterações endodônticas, especialmente em pacientes acometidos por doenças crônicas, tais como alterações cardiovasculares e diabetes.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

A partir dos resultados do presente estudo pode-se concluir:

1. O tratamento com tempol, na dose de 50 mg/kg, foi capaz de prevenir o desenvolvimento de periodontite apical, tanto em ratos cardiopatas, como em animais controle, como observado na análise radiográfica e histológica.
2. O tratamento com tempol, na dose de 30 mg/kg não foi efetivo em alterar significativamente ambos os parâmetros, radiográficos e histológicos, tanto em ratos cardiopatas, como em animais controle, permitindo sugerir um efeito dose-dependente para o tempol.
3. O tratamento com tempol (50 mg/kg) melhorou de forma geral os sinais relacionados com a cardiomiopatia, como perda de peso corporal e déficits da coordenação motora.
4. Pode-se sugerir que a terapia antioxidante com tempol (50 mg/kg) seria uma estratégia coadjuvante promissora em pacientes com doenças cardiovasculares, que precisam ser submetidos a terapias endodônticas.
5. O tratamento com o antioxidante tempol (100 mg/kg) alterou significativamente a perda de peso corporal, os níveis de insulina plasmática, revertendo também a redução dos níveis de catalase e GSH, em animais diabéticos.
6. Por outro lado, a administração de tempol, na dose de 100 mg/kg, não foi capaz de melhorar as lesões periapicais, em ratos com diabetes tipo 2, tanto na análise radiográfica, como na histológica.
7. Aparentemente, no diabetes tipo 2, as lesões periapicais são refratárias à terapia antioxidante.

REFERÊNCIAS

1. Rojas LM, Benitez K, Suarez SM, Boada-Sucre A, Ramirez Y, Romero MA, et al. [Ultra structure of retinopathy induced by hyperoxia in developing rats]. *Rev Invest Clin*. 2005 Nov-Dec;57(6):794-801.
2. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol*. 2009;27:165-97.
3. Ray A, Huisman MV, Tamsma JT, van Asten J, Bingen BO, Broeders EA, et al. The role of inflammation on atherosclerosis, intermediate and clinical cardiovascular endpoints in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Intern Med*. 2009 May;20(3):253-60.
4. Calcutt NA, Cooper ME, Kern TS, Schmidt AM. Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 May;8(5):417-29.
5. Rose LF, Mealey B, Minsk L, Cohen DW. Oral care for patients with cardiovascular disease and stroke. *J Am Dent Assoc*. 2002 Jun;133 Suppl:37S-44S.
6. Willcox BJ, Curb JD, Rodriguez BL. Antioxidants in cardiovascular health and disease: key lessons from epidemiologic studies. *Am J Cardiol*. 2008 May 22;101(10A):75D-86D.
7. Manfredi M, McCullough MJ, Vescovi P, Al-Kaarawi ZM, Porter SR. Update on diabetes mellitus and related oral diseases. *Oral Dis*. 2004 Jul;10(4):187-200.
8. Kidambi S, Patel SB. Diabetes mellitus: considerations for dentistry. *J Am Dent Assoc*. 2008 Oct;139 Suppl:8S-18S.
9. Lamster IB, Lalla E, Borgnakke WS, Taylor GW. The relationship between oral health and diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc*. 2008 Oct;139 Suppl:19S-24S.
10. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev*. 2004 Aug;25(4):612-28.
11. Feng L, Matsumoto C, Schwartz A, Schmidt AM, Stern DM, Pile-Spellman J. Chronic vascular inflammation in patients with type 2 diabetes: endothelial biopsy and RT-PCR analysis. *Diabetes Care*. 2005 Feb;28(2):379-84.
12. Deshpande AD, Harris-Hayes M, Schootman M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther*. 2008 Nov;88(11):1254-64.
13. Miley DD, Terezhalmay GT. The patient with diabetes mellitus: etiology, epidemiology, principles of medical management, oral disease burden, and principles of dental management. *Quintessence Int*. 2005 Nov-Dec;36(10):779-95.
14. Bender IB, Bender AB. Diabetes mellitus and the dental pulp. *J Endod*. 2003 Jun;29(6):383-9.
15. Leite MF, Ganzerla E, Marques MM, Nicolau J. Diabetes induces metabolic alterations in dental pulp. *J Endod*. 2008 Oct;34(10):1211-4.
16. Lalla RV, D'Ambrosio JA. Dental management considerations for the patient with diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc*. 2001 Oct;132(10):1425-32.
17. Wouters KA, Kremer LC, Miller TL, Herman EH, Lipshultz SE. Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. *Br J Haematol*. 2005 Dec;131(5):561-78.
18. Bast A, Haenen GR, Bruynzeel AM, Van der Vijgh WJ. Protection by flavonoids against anthracycline cardiotoxicity: from chemistry to clinical trials. *Cardiovasc Toxicol*. 2007;7(2):154-9.
19. Ismael MA, Talbot S, Carbonneau CL, Beausejour CM, Couture R. Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetyl-L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. *Eur J Pharmacol*. 2008 Jul 28;589(1-3):66-72.

20. Singh U, Jialal I. Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. *Nutr Rev*. 2008 Nov;66(11):646-57.
21. Khavandi K, Khavandi A, Asghar O, Greenstein A, Withers S, Heagerty AM, et al. Diabetic cardiomyopathy--a distinct disease? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009 Jun;23(3):347-60.
22. Barreiros AL B S DJ, David JP. ESTRESSE OXIDATIVO: RELAÇÃO ENTRE GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS E DEFESA DO ORGANISMO. *Quim Nova* 2006 2006;29(1):113-23.
23. Britto LR, Katz J, Guelmann M, Heft M. Periradicular radiographic assessment in diabetic and control individuals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Oct;96(4):449-52.
24. Fouad AF, Burleson J. The effect of diabetes mellitus on endodontic treatment outcome: data from an electronic patient record. *J Am Dent Assoc*. 2003 Jan;134(1):43-51; quiz 117-8.
25. Mindiola MJ, Mickel AK, Sami C, Jones JJ, Lalumandier JA, Nelson SS. Endodontic treatment in an American Indian population: a 10-year retrospective study. *J Endod*. 2006 Sep;32(9):828-32.
26. Iwama A, Nishigaki N, Nakamura K, Imaizumi I, Shibata N, Yamasaki M, et al. The effect of high sugar intake on the development of periradicular lesions in rats with type 2 diabetes. *J Dent Res*. 2003 Apr;82(4):322-5.
27. Hu FB. Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *Am J Clin Nutr*. 2003 Sep;78(3 Suppl):544S-51S.
28. Dias JP, Talbot S, Senecal J, Carayon P, Couture R. Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. *PLoS One*. 2010;5(9):e12622.
29. Liu L, Zhang C, Hu Y, Peng B. Protective effect of metformin on periapical lesions in rats by decreasing the ratio of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin. *J Endod*. 2012 Jul;38(7):943-7.
30. Ritchie RH, Quinn JM, Cao AH, Drummond GR, Kaye DM, Favaloro JM, et al. The antioxidant tempol inhibits cardiac hypertrophy in the insulin-resistant GLUT4-deficient mouse in vivo. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Jun;42(6):1119-28.
31. Rafikova O, Salah EM, Tofovic SP. Renal and metabolic effects of tempol in obese ZSF1 rats--distinct role for superoxide and hydrogen peroxide in diabetic renal injury. *Metabolism*. 2008 Oct;57(10):1434-44.
32. Banday AA, Marwaha A, Tallam LS, Lokhandwala MF. Tempol reduces oxidative stress, improves insulin sensitivity, decreases renal dopamine D1 receptor hyperphosphorylation, and restores D1 receptor-G-protein coupling and function in obese Zucker rats. *Diabetes*. 2005 Jul;54(7):2219-26.
33. Wilcox CS. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol Ther*. 2010 May;126(2):119-45.
34. Di Paola R, Mazzon E, Zito D, Maiere D, Britti D, Genovese T, et al. Effects of Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005 Oct;32(10):1062-8.
35. Sledzinski Z, Wozniak M, Antosiewicz J, Lezoche E, Familiari M, Bertoli E, et al. Protective effect of 4-hydroxy-TEMPO, a low molecular weight superoxide dismutase mimic, on free radical toxicity in experimental pancreatitis. *Int J Pancreatol*. 1995 Oct;18(2):153-60.
36. Zhang Y, Jang R, Mori TA, Croft KD, Schyvens CG, McKenzie KU, et al. The antioxidant Tempol reverses and partially prevents adrenocorticotrophic hormone-induced hypertension in the rat. *J Hypertens*. 2003 Aug;21(8):1513-8.

37. Richard C, Lauzier B, Delemasure S, Talbot S, Ghibu S, Collin B, et al. Effects of angiotensin-1 converting enzyme inhibition on oxidative stress and bradykinin receptor expression during doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008 Sep;52(3):278-85.
38. Lee YL, Hong CY, Kok SH, Hou KL, Lin YT, Chen MH, et al. An extract of green tea, epigallocatechin-3-gallate, reduces periapical lesions by inhibiting cysteine-rich 61 expression in osteoblasts. *J Endod.* 2009 Feb;35(2):206-11.
39. Hamann C, Goettsch C, Mettelsiefen J, Henkenjohann V, Rauner M, Hempel U, et al. Delayed bone regeneration and low bone mass in a rat model of insulin-resistant type 2 diabetes mellitus is due to impaired osteoblast function *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;301(6):E1220-8.
40. Sheludiakova A, Rooney K, Boakes RA. Metabolic and behavioural effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat. *Eur J Nutr.* 2012 Jun;51(4):445-54.
41. Armada-Dias L, Breda J, Provenzano JC, Breitenbach M, Rocas IN, Gahyva SM, et al. Development of periradicular lesions in normal and diabetic rats. *J Appl Oral Sci.* 2006 Oct;14(5):371-5.
42. Garber SE, Shabahang S, Escher AP, Torabinejad M. The effect of hyperglycemia on pulpal healing in rats. *J Endod.* 2009 Jan;35(1):60-2.
43. Kohsaka T, Kumazawa M, Yamasaki M, Nakamura H. Periapical lesions in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Endod.* 1996 Aug;22(8):418-21.
44. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004;27(Suppl 1):s5-s10.
45. Iwama A, Morimoto T, Tsuji M, Nakamura K, Higuchi N, Imaizumi I, et al. Increased number of anaerobic bacteria in the infected root canal in type 2 diabetic rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 May;101(5):681-6.

ANEXOS

ANEXOS A

Aprovação pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia/PUCRS



*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*


Porto Alegre 05 de novembro de 2009

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0052/09
Intitulado: Influência de desordens metabólicas no desenvolvimento de lesões periapicais em ratos: efeito da terapia antioxidante
Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Maria Martha Campos
Pesquisadores Associados Carlos Frederico Brilhante Wolle
Nível: Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 05 de novembro de 2009.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEUA/PUCRS


Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior
 Presidente da Comissão Científica e de Ética da
 Faculdade de Odontologia da PUCRS



ANEXO B

Aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animais/PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 013/10 – CEUA

Porto Alegre, 21 de janeiro de 2010.

Senhora Pesquisadora:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 09/00132, intitulado: **“Influência de desordens metabólicas no desenvolvimento de lesões periapicais em ratos: efeito da terapia antioxidante”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo Márcio C. Pitrez
Coordenador-adjunto do CEUA – PUCRS

Ilma. Sra.
Profª. Dra. Maria Martha Campos
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO C

Aceitação do Artigo 1 pelo Periódico *Journal of Endodontics*

Basic Research—Biology

Effects of the Antioxidant Agent Tempol on Periapical Lesions in Rats with Doxorubicin-induced Cardiomyopathy

Carlos Frederico Brilhante Wölle, MSc, Luciana de Aguiar Zollmann, BS,† Adriana Etges, PhD,‡ Graciela Schneider Vitalis, DDS,§ Carlos Eduardo Leite, MSc,|| and Maria Martha Campos, PhD*||*

JOE — Volume 38, Number 2, February 2012

ANEXO D

Submissão do Artigo 2 ao Periódico *Journal of Endodontics*

Ref.: Ms. No. JOE 12-832

Outcome of periapical lesions in a rat model of type-2 diabetes: refractoriness to systemic antioxidant therapy.

Dear Dr. Campos,

Your manuscript has been reviewed by 2 reviewers and appears suitable for publication in the Journal of Endodontics. However, prior to acceptance there are some revisions that have been suggested or required by the reviewers (see below).

After making the revisions, please submit a revised manuscript to the Journal of Endodontics web site.