

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS

Raquel Cristine Silva Barcelos

**INFLUÊNCIA DA PERIODONTITE APICAL SOBRE PARÂMETROS
DE ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADES DE ATPases EM
DIFERENTES ÓRGÃOS DE RATOS ADULTOS E JOVENS**

Santa Maria, RS
2020

Raquel Cristine Silva Barcelos

**INFLUÊNCIA DA PERIODONTITE APICAL SOBRE PARÂMETROS
DE ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADES DE ATPases EM
DIFERENTES ÓRGÃOS DE RATOS ADULTOS E JOVENS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, ênfase em Endodontia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Doutora em Ciências Odontológicas**.

Orientador: Dr. Carlos Alexandre de Souza Bier
Coorientadora: Dra. Marilise Escobar Bürger

Santa Maria, RS
2020

Barcelos, Raquel Cristine Silva
INFLUÊNCIA DA PERIODONTITE APICAL SOBRE PARÂMETROS DE
ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADES DE ATPases EM DIFERENTES
ÓRGÃOS DE RATOS ADULTOS E JOVENS / Raquel Cristine Silva
Barcelos.- 2020.
100 p.; 30 cm

Orientador: Carlos Alexandre de Souza Bier
Coorientador: Marilise Escobar Burger
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Odontológicas, RS, 2020

1. Lesão periapical 2. Bomba de cálcio 3. Bomba de
sódio 4. Sistema de defesa antioxidante I. Bier, Carlos
Alexandre de Souza II. Burger, Marilise Escobar III.
Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, RAQUEL CRISTINE SILVA BARCELOS, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Raquel Cristine Silva Barcelos

**INFLUÊNCIA DA PERIODONTITE APICAL SOBRE PARÂMETROS
DE ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADES DE ATPases EM
DIFERENTES ÓRGÃOS DE RATOS ADULTOS E JOVENS**

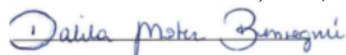
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, ênfase em Endodontia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de **Doutora em Ciências Odontológicas**.

Aprovada em 17 de abril de 2020:

Carlos Alexandre de Souza Bier, Dr.
(Presidente/Orientador)

Marilise Escobar Bürger, Dra.
(Coorientadora)

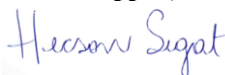
Carlos Frederico Brillhante Wolle, Dr. (UNINGÁ/RS)



Dalila Moter Benvegnú, Dra. (UFFS/PR)



Fernanda Geraldo Pappen, Dra. (UFPeL/RS)



Hecson Jesser Segat, Dr. (UFSM/RS)

Santa Maria, RS
2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Ao meu amor, Cristian Rafael Kroth dos Santos,
pelo apoio incondicional, pelos sorrisos, por estar sempre ao meu lado, pelo
companheirismo em todos os momentos. Muito obrigada pela espera, pela paciência, pelo
cuidado carinhoso. Com você sou mais forte para superar meus desafios! Obrigada por me
permitir fazer parte da sua vida!

**À minha família, minha base, o alicerce da minha vida: meus pais, Eronita e
Rubens; meus irmãos, Rose, Rosângela (*in memoriam*) e Rubens; meus sobrinhos,
Catiúscia, Thiago, Lorenzo, Nicolas, Eduardo, Enzo e Eric, meus cunhados Vilmar e
Tânia,**
pelo amor e incentivo a cada passo. Muito obrigada pela presença e vibração a cada
pequena conquista e grandes realizações. Eu amo vocês para sempre!

À minha mãe, Eronita Silva Barcelos,
pelo ser humano que é, por tudo que representa para mim e para nossa família, pela
sua força, sua dedicação à nós, amor incondicional, apoio, incentivo e resiliência. À você
dedico os sentimentos mais lindos que carrego em meu coração. Eu amo ser sua filha. Eu amo
você eternamente!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus

pela minha família, pela saúde e pela vida.

Ao meu orientador, professor Dr. Carlos Alexandre de Souza Bier,
muito obrigada por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a
manifestação do caráter e da afetividade na educação durante o processo de formação
profissional. Muito obrigada pela oportunidade e por ter não somente me ensinado, mas me
feito aprender.

À minha coorientadora, professora Dra. Marilise Escobar Bürger
que me inspira na trajetória acadêmica e que, incansavelmente, contribui para a minha
formação desde 2008. Obrigada por sempre me acolher e permitir o desenvolvimento de mais
este trabalho. Agradeço a confiança, os conhecimentos compartilhados e sua dedicação à
mim. Professores brilhantes ensinam para uma profissão. Professores fascinantes ensinam
para a vida (Augusto Cury). Você é fascinante!

Agradeço imensamente aos amigos Higor Zuquetto Rosa, Karine Roversi, Paula Tassoni Inchaki e Camilla Santos Tibúrcio Machado

pela imprescindível e preciosa ajuda na realização dos experimentos. Sem vocês, nada
disso seria possível! Esta tese é, sem dúvida, o resultado de um processo de construção em
meio a uma conjuração de afetos e amizades. Quem caminha sozinho pode até chegar mais
rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe (Clarice Lispector).

Agradeço aos colegas do grupo de Endodontia André Scherer, Anna Luiza Cruz, Carlos Eduardo Ribeiro, Cristiana Malta, Fabrício Vieira, Jeanni Camponogara,

Jéssica Trindade Lopes, Isabella Lena, Mônica Boligon e Natália Zago

pela agradável convivência, pelos momentos de descontração, pela troca de
experiências e pela colaboração na produção de novos conhecimentos.

Agradeço à Jéssica Trindade Lopes, minha dupla durante as clínicas de

Endodontia no doutorado,

pela paciência, pelo compartilhamento dos saberes acerca da técnica endodôntica, pela
amizade. Muito obrigada dupla!

Agradeço as grandes amigas, Fernanda Maia Pillusky, Carolina Righi Alves,

Patrícia Gerhard e Daniela Bittencourt,

por estarem sempre ao meu lado, me incentivando, ensinando e apoiando. Vocês me
inspiram e me impulsionam para frente! Muito obrigada!

À professora Dra. Renata Dornelles Morgental,

pelas contribuições dadas durante o doutorado, pelo compartilhamento do conhecimento e pelas orientações para a vida.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação (PPG) em Ciências Odontológicas,

por terem contribuído para a minha formação.

As colegas de doutorado da turma PPGCO 2017,

agradeço a parceria, a amizade e a troca de experiências durante o curso.

Aos funcionários do curso de Odontologia,

pela amizade e apoio técnico.

À Jéssica Dalcin da Silva,

pela disponibilidade e apoio prestado junto à secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Agradeço ao PROAP-UFSM, CNPq, Capes e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

pelo auxílio financeiro que viabilizou este trabalho.

Aos animais que tiveram suas vidas sacrificadas nos experimentos,

meu respeito e consideração.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas

pela infra-estrutura e pela possibilidade de realização deste curso.

*O importante não é chegar até aqui, mas ser.
E ser é uma ciência delicada de pequenas e grandes observações.*

Fernando Guimarães

RESUMO

INFLUÊNCIA DA PERIODONTITE APICAL SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADES DE ATPases EM DIFERENTES ÓRGÃOS DE RATOS ADULTOS E JOVENS

AUTORA: Raquel Cristine Silva Barcelos

ORIENTADOR: Dr. Carlos Alexandre de Souza Bier

COORIENTADORA: Dra. Marilise Escobar Bürger

A periodontite apical, processo inflamatório em torno do ápice da raiz de um dente, é uma sequela da infecção microbiana do espaço pulpar dos dentes e é um problema notavelmente disseminado. ATPases do tipo P, como a Na^+/K^+ -ATPase (NKA) e a Ca^{2+} -ATPase (CAA), criam gradientes de potencial eletroquímico para os diferentes íons essenciais para diversas funções celulares, variando desde a geração de potencial de membrana, até contração muscular e remoção de íons tóxicos das células. Tais enzimas transmembranares possuem uma regulação oxidativa e estão associadas à patogênese de várias doenças sistêmicas, como obesidade, diabetes, dislipidemia e aterosclerose. No entanto, sua relação com a periodontite apical ainda não foi relatada. Considerando que o estresse oxidativo está relacionado à patogênese da periodontite apical, este estudo foi desenvolvido para avaliar a influência da periodontite apical sobre parâmetros de estresse oxidativo e atividades de ATPases em diferentes órgãos de ratos adultos e jovens. Ratos Wistar machos adultos foram aleatoriamente designados a dois grupos experimentais: controle (CT; sem lesão periapical; n=8) e periodontite apical (AP; com periodontite apical; n=9). A periodontite apical foi induzida pela exposição pulpar do primeiro molar mandibular direito. Após 21 dias da indução da periodontite apical, os animais foram eutanasiados e as mandíbulas foram dissecadas para as análises radiográfica e histológica. Além disso, o coração, fígado, pâncreas e rins foram coletados para as análises bioquímicas da atividade da NKA, geração de espécies reativas (ER) e conteúdo de antioxidantes endógenos. A periodontite apical aumentou a atividade da NKA no coração, fígado e pâncreas; e aumentou a geração dos ER apenas no coração. No entanto, a mesma influência não foi observada nos rins. Enquanto no coração e no pâncreas foi observado uma redução das defesas antioxidantes endógenas, no fígado e no rim tais níveis foram aumentados. Na continuidade dos estudos, para verificar se existe influência da idade e de diferentes tempos de exposição pulpar sobre os mesmos parâmetros analisados, um segundo protocolo experimental foi desenvolvido com ratos Wistar machos jovens que foram também aleatoriamente designados a dois grupos experimentais: controle (CT; sem periodontite apical; n=21) e periodontite apical (PA; com periodontite apical; n=24). A periodontite apical foi induzida pela exposição pulpar do primeiro molar mandibular direito. Após 7, 14 e 21 dias da indução da periodontite apical, os ratos foram eutanasiados e as mandíbulas foram dissecadas para análise radiográfica. Além disso, o coração, fígado e o pâncreas foram coletados para as análises bioquímicas da geração de ER, níveis de lipoperoxidação e de carbonilação de proteínas, além das atividades da NKA e da CAA. A periodontite apical induziu danos oxidativos no coração, fígado e pâncreas, observados principalmente 21 dias após a exposição pulpar. Além disso, a periodontite apical foi relacionada à redução das atividades da NKA e da CAA em todos os órgãos analisados, exceto no pâncreas, no qual se observou um aumento na atividade da CAA em todos os tempos avaliados. A redução da atividade da NKA e da CAA, a modulação do sistema de defesa antioxidante endógeno e o aumento dos danos oxidativos observados nesse estudo sugerem que a alteração do gradiente eletroquímico celular e o estresse oxidativo podem estar envolvidos na fisiopatologia da periodontite apical.

Palavras-chave: Lesão Periapical. Bomba de cálcio. Bomba de Sódio. Sistema de Defesa Antioxidante.

ABSTRACT

INFLUENCE OF APICAL PERIODONTITIS ON OXIDATIVE STRESS PARAMETERS AND Na⁺K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase ACTIVITIES IN DIFFERENT STAGES OF RAT DEVELOPMENT

AUTHOR: Raquel Cristine Silva Barcelos
ADVISOR: Dr. Carlos Alexandre de Souza Bier
CO-ADVISOR: Dra. Marilise Escobar Bürger

Apical periodontitis, inflammatory process around the apex of a tooth root, is primarily a sequel to microbial infection of the pulp space of teeth and is a remarkably widespread problem. P-type ATPases, as Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) and Ca²⁺-ATPase (CAA), create electrochemical potential gradients for the different ions essential for various cellular functions. Such transmembrane enzymes have an oxidative regulation and are associated with the pathogenesis of various systemic diseases. However, its relationship with apical periodontitis has not yet been reported. Considering that oxidative stress is related to the pathogenesis of apical periodontitis, this study was designed to evaluate the influence of apical periodontitis on oxidative stress parameters and ATPases activities in different organs of adult and young rats. Adult male Wistar rats were randomly assigned to two experimental groups: control (CT; no periapical lesion; n=8) and apical periodontitis (AP; with apical periodontitis; n=9). Apical periodontitis was induced by pulpal exposure of the right mandibular first molar. After 21 days of apical periodontitis induction, the rats were euthanized and the jaws dissected for radiographic and histological analysis. In addition, the heart, liver, pancreas and kidneys were collected for biochemical analyzes of NKA activity, reactive species (RS) generation and endogenous antioxidant content. Apical periodontitis increased NKA activity in the heart, liver and pancreas; increased RS generation only in the heart. However, the same influence was not observed in the kidney. While in the heart and pancreas was observed a reduction in endogenous antioxidant defenses, in the liver and kidney such levels were increased. NKA activity and endogenous antioxidant defense system modulations observed in this study suggest that alteration of cellular electrochemical gradient and antioxidant status may be involved in the pathophysiology of apical periodontitis. To continue the studies, to verify if there is influence of age and different pulp exposure times on the same parameters analyzed, a second experimental protocol was developed with young male Wistar rats that were also randomly assigned to two experimental groups: control (CT; no apical periodontitis; n = 21) and apical periodontitis (AP; with apical periodontitis; n = 24). Apical periodontitis was induced by pulpal exposure of the right mandibular first molar. After 7, 14 and 21 days of apical periodontitis induction, the rats were euthanized and the mandibles were dissected for radiographic analysis. In addition, the heart, liver, pancreas and kidney were collected for biochemical analyzes of the RS generation, levels of the lipoperoxidation and protein carbonyls, besides NKA and CAA activities. Apical periodontitis induced oxidative damage to the heart, liver and pancreas, observed mainly 21 days after pulp exposure. In addition, apical periodontitis was related to reduced activities in NAK and CAA in all organs analyzed, except the pancreas, in which an increase in CAA activity was observed at all times evaluated. The reduction in the activity of NKA and CAA, the modulation of the endogenous antioxidant defense system and the increase in oxidative damage observed in this study suggest that changes in the cellular electrochemical gradient and oxidative stress may be involved in the pathophysiology of apical periodontitis.

Keywords: Periapical Lesion. Calcium Pump. Sodium Pump. Antioxidant Defense System.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
Ca ²⁺	Cálcio
CAA	Bomba de cálcio; Ca ²⁺ -ATPase
Ca ²⁺ -ATPase	Bomba de cálcio
CaM	Calmodulina
CAT	Catalase
CT	Grupo controle
DCFH-DA	2',7'-diclorofluoresceína diacetato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPB	2,4-dinitrofenil-hidrazina
DTNB	5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico
ER	Espécies reativas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutathiona peroxidase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
H ⁺	Hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Human immunodeficiency virus; vírus da imunodeficiência humana
HOO [·]	Hidroperoxil
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
K ⁺	Potássio
MDA	Malondialdeído
Na ⁺	Sódio
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Bomba de sódio ou Bomba de sódio-potássio
NKA	Bomba de Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
O ₂ ⁻	Radical superóxido
¹ O ₂	Oxigênio singleto
•OH	Radical hidroxil
Pi	Fosfato inorgânico
SOD	Superóxido dismutase
TBA	Thiobarbituric acid, ácido tiobarbitúrico
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Tumoral necrosis factor; fator de necrose tumoral
VIT C	Vitamina C

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO	14
1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	DESENVOLVIMENTO	18
3.1	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1.1	A periodontite apical	18
3.1.2	A periodontite apical e as espécies reativas de oxigênio (EROs)	20
3.1.3	As EROs, o estresse oxidativo e o sistema de defesa antioxidante	21
3.1.4	As doenças sistêmicas e a periodontite apical	24
3.1.5	Teoria da infecção focal	25
3.1.6	A enzima Na ⁺ K ⁺ -ATPase (NKA)	26
3.1.7	A enzima Ca ²⁺ -ATPase (CAA)	30
3.2	JUSTIFICATIVA	34
3.3	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	34
3.3.1	Manuscrito 1 – Apical periodontitis induces changes on oxidative stress parameters and increases Na ⁺ /K ⁺ -ATPase activity in adult rats	34
3.3.2	Manuscrito 2 – Apical periodontitis increases oxidative damages and impairs ATPases activity in different organs of the young rats	51
4	DISCUSSÃO	71
5	CONCLUSÕES FINAIS	78
	REFERÊNCIAS	80
	ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFSM)	100

APRESENTAÇÃO

Esta tese está estruturada em seções dispostas da seguinte forma: Introdução, Objetivos, Desenvolvimento (Revisão bibliográfica, Manuscritos científicos 1 e 2), Discussão, Conclusões finais e Referências.

Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se inseridos nos próprios manuscritos na seção **PRODUÇÃO CIENTÍFICA**, estão formatados conforme as normas dos periódicos internacionais em que serão submetidos e representam a íntegra deste estudo.

Ao fim dessa tese encontram-se os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES FINAIS**, nos quais há interpretações e comentários gerais dos manuscritos científicos contidos neste estudo.

As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, REVISÃO DA LITERATURA** e **DISCUSSÃO**.

1 INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos sobre a prevalência da periodontite apical em diferentes países revelaram que esta consiste em um problema de saúde bucal notavelmente difundido (FIGDOR, 2002). A periodontite apical geralmente resulta da infecção pulpar causada por bactérias anaeróbias dentro do canal radicular dos dentes, onde se organizam em biofilmes e pode estar relacionada à dor. Os agentes microbianos que invadem o ambiente endodôntico e seus produtos desencadeiam a resposta imunoinflamatória (NAIR, 2004) que pode levar à formação de uma lesão apical osteolítica causada pela resposta imune à infecção endodôntica (DEZEREGA et al., 2012; KAKEHASHI et al., 1965). As espécies reativas de oxigênio (EROs), produzidas pelas células fagocíticas em resposta ao desafio bacteriano, representam um importante mecanismo de defesa do hospedeiro e o balanço redox perturbado resulta em lesão tecidual. Nas patologias de origem bacteriana que levam à reabsorção óssea, como a periodontite apical, as EROs são um dos mecanismos patogênicos mais eficazes (ZARAGOZA et al., 2006).

A geração de EROs é uma parte integrante característica do metabolismo celular normal e participa da sinalização celular e de processos metabólicos, afetando funções celulares que incluem expressão gênica, proliferação, morte, migração e inflamação (XIANG; FAN, 2010). As EROs incluem radicais livres de oxigênio e espécies não radicalares de oxigênio. Os primeiros correspondem a espécies que contêm um ou mais elétrons desemparelhados na última camada de valência, são geralmente reativos com outras espécies e incluem o radical superóxido (O_2^-) e ânion hidroxil ($\bullet OH$). As espécies não radicalares são agentes oxidantes ou são facilmente convertidos em radicais, ou ambos, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), entre outros (CHAPPLE, 1997; TRIVEDI; LAL, 2017). Além disso, outras espécies reativas derivadas de nitrogênio e cloro podem ser importantes, como o óxido nítrico e ácido hipocloroso (BISWAS, 2016).

Os antioxidantes minimizam os efeitos das EROs e podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em concentrações comparadas com as de um substrato oxidável, atrasam significativamente ou inibem a oxidação desse substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Os mecanismos antioxidantes endógenos envolvem reações enzimáticas e não enzimáticas. Os antioxidantes enzimáticos são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e as peroxidases dependentes de tiol (glutationa peroxidase (GSH-Px) e peroxirredoxinas); os antioxidantes não enzimáticos incluem os tiois (glutationa reduzida (GSH)), a coenzima Q10, o ácido úrico, a bilirrubina, o ácido ascórbico, entre outros; e ainda substâncias obtidas a partir da dieta, como vitaminas lipossolúveis, compostos polifenólicos,

carotenóides, tocoferóis, ácido fólico, cisteína e outros (CAROCHO; FERREIRA, 2013; CHAPPLE; MATTHEWS, 2007; FLOHE, 2016).

O quadro de estresse oxidativo estará instalado quando a produção das EROs exceder a capacidade antioxidante tecidual (EBADI; SRINIVASAN; BAXI, 1996; JENNER; OLNAW, 1996). Assim, um aumento na produção de EROs ou uma redução nas defesas antioxidantes endógenas, ou ambos, culminam no estresse oxidativo (ROCHETTE et al., 2014). O estresse oxidativo contribui para doenças sistêmicas, incluindo aterosclerose, artrite e câncer, e estudos recentes demonstraram o seu envolvimento também na patogênese da lesão periapical (AKALIN et al., 2007; 2008; DEZEREGA et al., 2012; INCHINGOLO et al., 2014; MINCZYKOWSKI et al., 2001). O estresse oxidativo também pode modular a atividade de enzimas integrais de membrana como as ATPases (ERMAK; DAVIES, 2002; GROVER; SAMSON, 1988; GROVER; SAMSON; FOMIN, 1992; KAUR; SHARMA; SINGH, 2001; PIERRE et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2011; 2012). A Na^+K^+ ATPase (NKA) e a Ca^{2+} ATPase (CAA), duas ATPases do tipo P, são enzimas transmembranares que controlam o fluxo de íons através do transporte ativo de potássio (K^+) e sódio (Na^+), e cálcio (Ca^{2+}), respectivamente, em quase todas as células eucarióticas superiores (BRINI, 2009; DI LEVA et al., 2008; JORGENSEN, 1982; KÜHLBRANDT, 2004; RICE et al., 2001; SWEADNER; DONNERT, 2001). Esses íons desempenham um papel fundamental no controle da homeostasia e dos gradientes eletroquímicos celulares. Além disso, descobriu-se uma função de sinalização, assim como seus envolvimento em doenças neurodegenerativas como o Alzheimer e sistêmicas como as doenças cardiovasculares, condições relacionadas a um desequilíbrio denominado estresse oxidativo (LI et al., 2011; YAN; SHAPIRO, 2016).

Evidências mostram uma regulação oxidativa da atividade das ATPases (CHOUDHARY; BODAKHE, 2016; ILHARA; KAGEYAMA; KONDO, 2005). No entanto, tal associação nunca foi relatada na periodontite apical, embora ambos os eventos (atividade das ATPases e periodontite apical) sejam influenciados pelo estresse oxidativo (CHOUDHARY; BODAKHE, 2016; DEZEREGA et al., 2012; INCHINGOLO et al., 2014; MINCZYKOWSKI et al., 2001). Considerando que evidências científicas mostram que o estresse oxidativo desempenha um papel na patogênese da lesão periapical (DEZEREGA et al., 2012; INCHINGOLO et al., 2014; MINCZYKOWSKI et al., 2001), e que pode influenciar a atividade das ATPases (CHOUDHARY; BODAKHE, 2016; ILHARA; KAGEYAMA; KONDO, 2005), o presente estudo objetivou investigar a influência da periodontite apical sobre parâmetros de estresse oxidativo e atividades de ATPases em diferentes órgãos de ratos adultos e jovens.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da periodontite apical sobre parâmetros de estresse oxidativo e atividades de ATPases em diferentes órgãos de ratos adultos e jovens.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Manuscrito 1:

No coração, fígado, pâncreas e rim de ratos adultos, avaliar a influência da periodontite apical sobre:

- Parâmetros de estresse oxidativo;
- A atividade da NKA.

Manuscrito 2:

No coração, fígado e pâncreas de ratos jovens após três diferentes tempos de exposição pulpar, avaliar a influência da periodontite apical sobre:

- Parâmetros de estresse oxidativo;
- A atividade da NKA;
- A atividade da CAA.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 REVISÃO DA LITERATURA

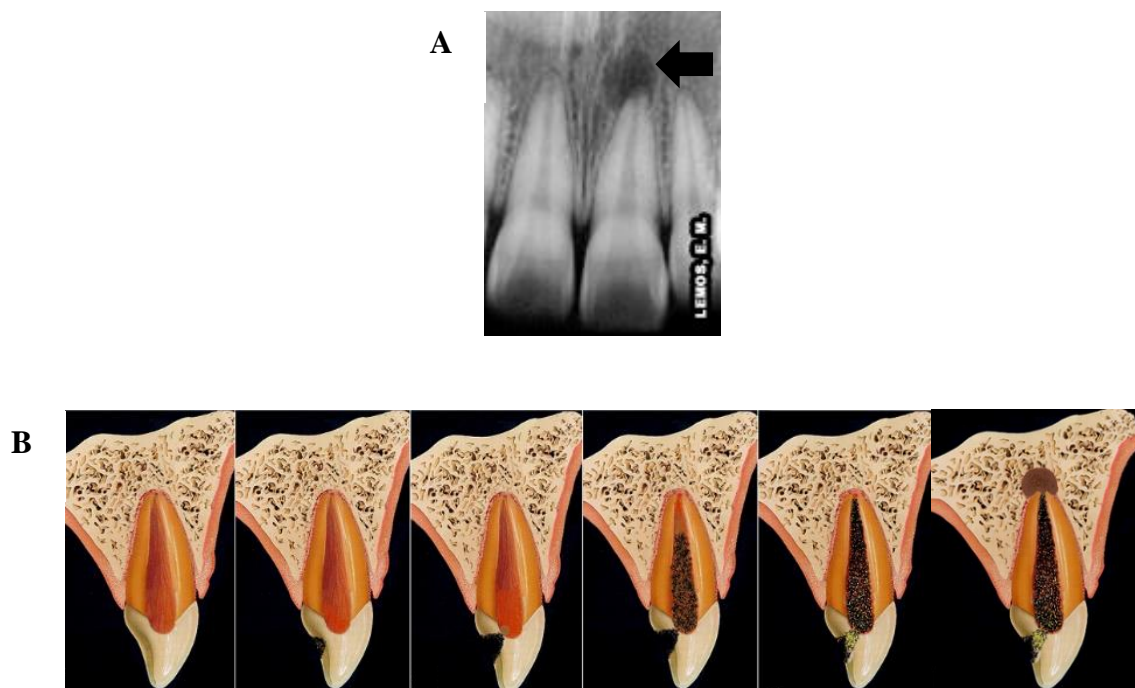
3.1.1 A periodontite apical

A Endodontia é a ciência e a arte que envolve a etiologia, a prevenção, o diagnóstico e o tratamento das alterações patológicas da polpa dentária e de suas repercussões na região periapical como a periodontite apical e, conseqüentemente, no organismo (LEONARDO, 2009; AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS, 2013). A periodontite apical é uma condição multifatorial complexa, originada de uma polpa necrótica infectada ou de um tratamento endodôntico mal sucedido. Frequentemente se desenvolve de forma assintomática e o prognóstico é menos favorável quando é detectada tardiamente (BERLINCK et al., 2015). A periodontite apical é uma inflamação aguda ou crônica do periodonto, localizada no ápice radicular induzida por microrganismos presentes no sistema de canais radiculares que leva a destruição dos tecidos perirradiculares (DEZEREGA et al., 2012; FIGDOR, 2002; KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965). É a consequência mais comum da cárie dentária não tratada e pode conduzir à perda dentária. Assim, de um modo geral, as lesões periapicais têm início a partir de uma necrose da polpa dentária. E, quando o crescimento bacteriano atinge o sistema de canais radiculares, há o recrutamento de células inflamatórias e a conseqüente geração de citocinas e enzimas líticas, além da ativação dos osteoclastos, que culminam na reabsorção do osso alveolar (XIONG, WEI, PENG, 2009). A marca registrada da periodontite apical é a presença de uma lesão apical que resulta da destruição de tecidos apicais duros e moles (NAIR, 2004; VERNAL et al., 2006)(Figura 1).

A periodontite apical é relatada como uma doença que afeta de forma generalizada as populações adultas de várias nacionalidades, atingindo populações de países da Europa, América do Norte e Austrália (BOUCHER et al., 2002; DE CLEEN et al., 1993; ERIKSEN et al., 1995; FIGDOR, 2002; HOMMEZ et al., 2002; JIMÉNEZ-PINZÓN et al., 2004; MARQUES et al., 1998; SIDARAVICIUS et al., 1999). Estudos epidemiológicos relataram que a frequência da periodontite apical varia de 1,4% a 8,0%, utilizando o dente como uma unidade (FRISK; HAKEBERG, 2005; IMFELD, 1991). No entanto, quando os indivíduos são considerados a unidade, a prevalência pode chegar a 70%, aumentando com a idade (FRISK; HAKEBERG, 2005). No Brasil, é a doença endodôntica mais prevalente em ambos os sexos (34,81%) (OLIVEIRA; CÂMARA; AGUIAR, 2016), concordando com estudos realizados em

outras populações, como Buenos Aires (Argentina) (SCAVO et al., 2011), Bucaramanga e Floridablanca (Colômbia) (MORENO et al., 2013) e Barcelona (Espanha) (ABELLA et al., 2014), nas quais variou de 27% a 49%. No entanto, esses resultados foram superiores aos relatados em outras pesquisas realizadas nas populações inglesa (4,1%)(DI FILIPPO; SIDHU; CHONG, 2014), escocesa (5,8%)(DUTRA; SMITH-JACK; SAUNDERS, 2014) e Kosoviana (12,3%)(KAMBERI et al., 2011). As discrepâncias observadas entre esses estudos podem ser justificadas pelos diferentes graus de desenvolvimento humano entre essas populações (OLIVEIRA; CÂMARA; AGUIAR, 2016). Nos países desenvolvidos, a prevalência dessa doença entre adultos de 35 a 45 anos é de 34% a 61% e também aumenta com a idade (COTTI et al., 2011a). Outras populações estudadas como as da Turquia (67,9%), Kosovo (46,3%), Lituânia (39%), Dinamarca (52%), Bélgica (40%), Canadá (44% e 51%), Alemanha (61%), Escócia (51%), Espanha (64,5%) e Estados Unidos (39%) demonstram que a periodontite apical afeta uma proporção significativa de pessoas (ERIKSEN et al., 1995; WEIGER et al., 1997).

Figura 1 – Radiografia periapical do incisivo central direito com uma lesão periapical (seta)(A) e esquema da progressão de uma cárie culminando na lesão endodôntica (B)



Fonte: Endo-e. Disponível em: <http://www.endo-e.com/images/doencas_polpa/doencas_polpa.htm>. Acesso em: ago. 2019; Endodontia Avançada. Disponível em: <<https://www.endodontiaavancada.com/diagnostico-clinico-pulpar-e-periapical-parte-i/>>. Acesso em: ago. 2019.

A periodontite apical é uma lesão inflamatória dos tecidos perirradiculares que ocorre, principalmente, devido à saída de irritantes, como bactérias e toxinas, de uma polpa inflamada ou necrótica (TORABINEJAD, 1994). Seu papel evolutivo é protetor: conter as bactérias do canal radicular e prevenir a disseminação da infecção. Enquanto a grande maioria dos casos é assintomática, as exacerbações da periodontite apical podem se apresentar como periodontite apical sintomática ou abscesso apical agudo (BERGENHOLTZ; HORSTED-BINDSLEV; REIT, 2010). A periodontite apical sintomática pode surgir tanto de um dente anteriormente sadio que sofreu ruptura pulpar ou de um dente com uma periodontite apical previamente assintomática. É caracterizada por uma dor latejante ou que é exacerbada pela mordida. O dente afetado, geralmente, tem uma resposta negativa ou positiva tardia aos testes de vitalidade e é, usualmente, altamente sensível às forças de percussão (BERGENHOLTZ; HORSTED-BINDSLEV; REIT, 2010).

Os abscessos apicais agudos desenvolvem-se na presença de uma periodontite apical preexistente (CARROTTE, 2004). A presença persistente de material infeccioso dentro do sistema de canais radiculares e ao redor do ápice de um dente pode levar a um influxo massivo de leucócitos polimorfonucleares nos tecidos perirradiculares, levando à liquefação tecidual e à formação de pus (BERGENHOLTZ; HORSTED-BINDSLEV; REIT, 2010). Também conhecido como abscesso periapical, dentoalveolar ou alveolar, um abscesso apical é caracterizado pelo acúmulo de pus nos tecidos perirradiculares e pode se apresentar como uma lesão aguda ou crônica. Pessoas com abscessos apicais agudos queixam-se de uma dor de início rápido, espontânea, sensibilidade do dente à pressão, formação de pus e inchaço dos tecidos associados (GLICKMAN, 2009). Sem tratamento, o abscesso pode se espalhar, resultando em uma infecção de cabeça e pescoço grave, potencialmente fatal, acompanhada de febre, mal-estar e envolvimento de linfonodos (ABBOTT, 2004). A periodontite apical sintomática e o abscesso apical agudo representam um continuum do mesmo processo de doença (SUTHERLAND; MATTHEWS, 2004).

3.1.2 A periodontite apical e as espécies reativas de oxigênio (EROs)

Como existe um equilíbrio exato entre a produção e a eliminação de EROs na cavidade oral, um aumento na produção e/ou uma redução na eliminação das EROs pode aumentar o risco para as doenças orais. Além disso, uma produção aumentada de espécies oxidantes relacionadas às doenças orais, como a periodontite apical crônica, pode ter implicações sistêmicas. Muitas espécies bacterianas podem participar na patogênese de doenças

endodônticas (GIULIANA et al., 1997) e o aumento dos processos inflamatórios mediados por esses patógenos, juntamente com o recrutamento de leucócitos por quimiotaxia, criam um ataque oxidativo diretamente dependente da intensidade da infecção (STEEVES et al., 2011).

A geração de EROs representa um importante mecanismo patogênico das doenças associadas à infiltração fagocítica e à reabsorção óssea (YOON et al., 2002; ZARAGOZA et al., 2006), como um mecanismo de defesa do hospedeiro contra o patógeno invasor (CHAPPLE, 1997). Já foi demonstrado que os neutrófilos do sangue periférico de indivíduos com periodontite apical apresentam um aumento na produção de EROs (D'AIUTO et al., 2010; MINCZYKOWSKI et al., 2001). Evidências científicas mostram que a morte oxidativa, realizada a partir de neutrófilos, frente a bactérias patogênicas, é frequentemente o primeiro estágio do dano ósseo. Esse processo é observado especialmente em algumas patologias dentárias, como a periodontite apical aguda, na qual os neutrófilos mostraram aumento da produção de EROs, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o ânion superóxido (O^{2-}), que retornam aos níveis basais após o tratamento odontológico (MINCZYKOWSKI et al., 2001).

Um estudo prospectivo mostrou que indivíduos afetados pela periodontite apical crônica são expostos a um elevado quadro de estresse oxidativo sistêmico, o que é extremamente perigoso para a saúde. Essa condição de estresse oxidativo mostra sua ação primária próximo ao sítio em que há a presença do agente patogênico (INCHINGOLO et al., 2014). Até o momento, em relação a parâmetros de estresse oxidativo, os estudos realizados avaliaram exclusivamente as alterações encontradas no fluido crevicular (DEZEREGA et al., 2012) e nos neutrófilos polimorfonucleares isolados do sangue periférico (MINCZYKOWSKI et al., 2001) dos pacientes investigados. A partir desses achados, podemos inferir que a influência da doença endodôntica crônica sobre o estresse oxidativo sistêmico pode ser uma causa significativa na patogênese de algumas doenças sistêmicas graves, como insuficiência renal e cardíaca, diabetes, aumentando o fator de risco para pacientes com periodontite apical crônica. Além disso, um problema potencial adicional, que poderia resultar do estresse oxidativo sistêmico em pacientes com periodontite apical crônica é a aceleração do início clínico de certas doenças que, de outra forma, teriam um curso subclínico mais longo, com menos dano ao paciente e, portanto, menor impacto nas despesas de saúde pública (INCHINGOLO et al., 2014).

3.1.3 As EROs, o estresse oxidativo e o sistema de defesa antioxidante

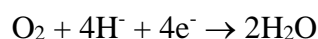
O oxigênio é um elemento indispensável para a vida e possui um papel dual: pode tanto promover, quanto deteriorar a saúde (PATEL et al., 2015). Os efeitos deletérios do oxigênio

ficaram desconhecidos até a teoria dos radicais livres de Gershman e colaboradores (1954), que trata da toxicidade do oxigênio e afirma que essa é devido às suas formas parcialmente reduzidas.

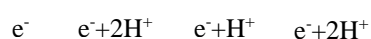
As espécies químicas reativas podem ser definidas como átomos, moléculas orgânicas ou inorgânicas, ou íons altamente reativos capazes de existir sob formas independentes e que podem conter um ou mais elétrons desemparelhados na camada de valência (HALLIWELL, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Tal configuração confere meia-vida curta, alta instabilidade e recombinação química quase que imediata (POMPELLA, 1997). Podem ser geradas na membrana celular, na mitocôndria ou no citoplasma e, dependendo do local de formação, são capazes de danificar lipídios, proteínas, carboidratos e DNA (ANDERSON, 1996; YU; ANDERSON, 1997).

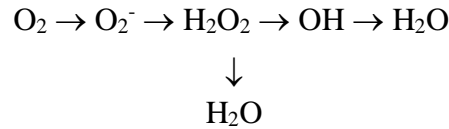
Em nível estrutural, as espécies químicas reativas podem ser divididas entre espécies reativas de oxigênio (EROs), tal como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxil ($OH\cdot$), o oxigênio singlete (1O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2); espécies reativas de nitrogênio; espécies reativas carboniladas, e espécies reativas de cloreto (INCHINGOLO et al., 2014). As EROs e as espécies reativas de nitrogênio são reconhecidas por desempenhar um papel duplo, ou seja, são prejudiciais e benéficas (SIVANANDHAM, 2011). As EROs são moléculas altamente reativas derivadas do metabolismo do oxigênio e, *in vivo*, algumas delas desempenham papéis construtivos na fisiologia celular. No entanto, elas também podem causar grande destruição das membranas celulares, como peroxidação lipídica e diminuição da fluidez da membrana, e mutações no DNA, podendo ocasionar neoplasias, doenças degenerativas, entre outras (AMES, 1998; CERUTTI, 1991; FINKEL; HOLBROOK, 2000; HARMAN, 1994). Uma vez produzidas, as EROs são capazes de desencadear reações de propagação nas quais reagem com outras moléculas orgânicas e causam adição, rearranjo, fragmentação ou reações de transferência (FERREIRO-VERA et al., 2011) que podem resultar em dano oxidativo.

O sistema de transporte mitocondrial é uma fonte importante de EROs, no qual a citocromo oxidase promove a redução completa de uma molécula de oxigênio (O_2) em duas moléculas de água (SOUTHORN; POWIS, 1988). Contudo, nem sempre há a formação diretamente de água a partir do oxigênio. Em virtude da sua configuração eletrônica, o oxigênio tende a receber um elétron de cada vez, formando intermediários reativos e tóxicos, como o radical hidroxil, radical superóxido e peróxido de hidrogênio (MENEHINI, 1988).



Reação de redução completa da molécula de O_2 .

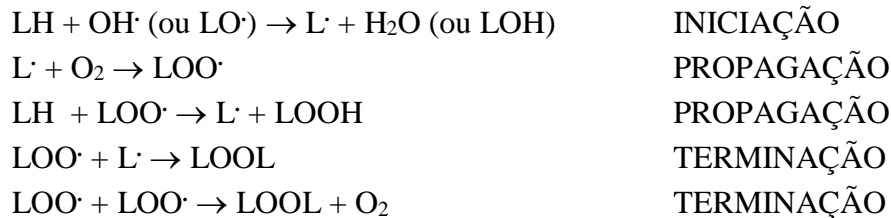




Reação de redução da molécula de O_2 e intermediários reativos.

O radical hidroxil é um dos mais potentes oxidantes, uma vez que é capaz de atravessar as membranas celulares e reagir com moléculas como DNA e lipídios (ANDERSON, 1996). O peróxido de hidrogênio, por sua vez, pode atravessar a membrana nuclear e induzir danos no DNA (ANDERSON, 1996; CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é definida como a oxidação dos lipídios poli-insaturados componentes das membranas celulares e organelas, como as mitocôndrias e peroxissomas (CHAMPE; HARVEY, 2000). A peroxidação lipídica é um processo que consiste em reações em cadeia que podem ser divididas em três fases, nomeadamente, iniciação, propagação e terminação (BOVERIS, 1998). Etapas da peroxidação lipídica:



Uma vez que as EROs são potencialmente prejudiciais, o organismo possui mecanismos antioxidantes de defesa que incluem sistemas enzimáticos e não enzimáticos. O primeiro inclui as enzimas SOD, CAT e glutathione peroxidase (GPx). A SOD catalisa a formação de H_2O_2 a partir do radical superóxido, enquanto a CAT age na eliminação do H_2O_2 promovendo sua catálise até água. A GPx converte a GSH à glutathione oxidada (GSSG), removendo H_2O_2 e formando água (LOHR; KUCZENSKI; NICULESCU, 2003). O sistema não enzimático inclui compostos sintetizados pelos seres vivos como bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico e outros compostos presentes na dieta como ácido ascórbico (VIT C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor da vitamina A) e grupos fenólicos de plantas (flavonoides) (GERARDI et al., 2002; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). O sistema antioxidante de defesa, juntamente com outros mecanismos de remoção, inativação e reparação, atuam para reduzir o estresse oxidativo e proteger contra os danos oxidativos (INCHINGOLO et al., 2014).

O aumento da geração das EROs pode ser observado não apenas em resposta a condições fisiológicas, mas também como resultado de infecções e condições patológicas. Quando a geração das EROs aumentam intensamente, resultam em danos significativos nas estruturas celulares durante o estresse oxidativo. As EROs são citotóxicas e têm sido envolvidas na etiologia de várias doenças (CHAPPLE, 1997). Assim, as EROs podem matar bactérias, mas também podem destruir os tecidos hospedeiros infectados adjacentes (BATTINO et al., 2002).

3.1.4 As doenças sistêmicas e a periodontite apical

Estudos mostram que doenças sistêmicas e infecções bucais estão intimamente relacionadas uma vez que ambas compartilham muitos fatores de risco (BAHEKAR et al., 2007; HUJOEL, 2002; LOCKHART et al., 2012). A translocação bacteriana de bactérias Gram-negativas pode ser induzida pela doença periodontal e também pela periodontite apical crônica (BERK et al., 2013; HERATH et al., 2016). Uma revisão sistemática relatou que pode haver uma correlação entre algumas doenças sistêmicas e a patogênese das doenças endodônticas (KHALIGHINEJAD et al., 2016). Em um estudo observacional, Cotti et al. (2011b) encontraram uma disfunção endotelial precoce em homens jovens com periodontite apical em comparação com controles saudáveis. A periodontite apical foi associada ao aumento dos níveis de marcadores inflamatórios, como interleucinas, imunoglobulinas, dimetilarginina assimétrica e proteína C-reativa em humanos (GOMES et al., 2013). Esses achados sugerem que a periodontite apical contribui para uma resposta imune sistêmica, levando ao aumento da inflamação sistêmica e não se limita a uma lesão localizada, o que pode levar a um aumento do risco para doenças cardiovasculares (GOMES et al., 2013). Recentemente uma revisão sistemática (BERLIN-BRONER; FEBBRAIO; LEVIN, 2017) e duas revisões narrativas demonstraram uma associação positiva plausível entre periodontite apical e a doença cardiovascular (COTTI et al., 2011a; GARG; CHAMAN, 2016).

A periodontite apical crônica não somente causa destruição inflamatória do tecido local, mas também respostas inflamatórias sistêmicas, o que pode predispor à doenças sistêmicas (AMAR; HAN, 2003; BERK et al., 2013; KINANE; LOWE, 2000; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005). Estudos prévios que investigaram a associação entre infecções orais e diabetes têm mostrado que periodontite apical pode aumentar os níveis de triglicérides (CINTRA et al., 2013), as concentrações de glicose no sangue (CINTRA et al., 2014a; c), células inflamatórias séricas (CINTRA et al., 2014b), bem como alterar o peso dos órgãos de ratos (CINTRA et al., 2017). Além disso, a imunoativação e o processo inflamatório crônico

são acompanhados pelo aumento da produção de EROs e espécies reativas de nitrogênio (LIU et al., 2015; MAES et al., 2011; MOYLAN et al., 2014). E, quando a razão pró-oxidantes/antioxidantes aumenta, o dano pelo estresse oxidativo e nitrosativo pode causar peroxidação dos lipídios da membrana e moléculas de ancoragem, oxidação proteica e hipernitrosilação (MAES et al., 2011; MOYLAN et al., 2014). Em consonância com isso, estudos recentes mostram que pacientes com depressão clínica apresentam aumento dos níveis de peróxidos, como o malondialdeído (MDA), um indicador de peroxidação lipídica e produtos avançados de oxidação proteica (indicador de oxidação proteica e produção de óxido nítrico) (ANDERSON et al., 2014; LIU et al., 2015; MAES et al., 2011; MOYLAN et al., 2014). Já foi demonstrado o aumento dos níveis de endotoxinas no canal radicular durante a periodontite apical crônica como causa da depressão e da menor qualidade de vida, que podem ser parcialmente explicado pela ativação das vias do oxigênio e nitrogênio (GOMES et al., 2008).

3.1.5 Teoria da infecção focal

Em 1891, W. Miller publicou sua teoria sobre a infecção focal, indicando que microorganismos e/ou seus produtos são capazes de acessar partes do corpo adjacentes ou distantes da boca (MILLER, 1981). Subsequentemente, Billings especulou que dentes infectados e as tonsilas poderiam ser responsáveis por algumas infecções focais como artrite, reumatismo, nefrite, endocardite e outras doenças (BILLINGS, 1914). Os proponentes desse conceito defendem que os microorganismos do biofilme dental e seus metabólitos podem alcançar a circulação sanguínea e induzir muitas doenças sistêmicas e condições degenerativas. A disseminação dessa teoria resultou em uma época em que os dentes foram extraídos em vez de serem tratados endodonticamente. De fato, as extrações não foram apenas destinadas a tratar essas doenças sistêmicas, mas também atuavam como uma medida profilática para reduzir o risco de desenvolvê-las. No entanto, como muitos dentes foram submetidos à exodontia sem evidência de infecção, tal teoria foi desacreditada e ignorada por muitos anos (PIZZO, et al., 2010). Finalmente, a British Dental Association (1996) e a American Association of Endodontists (2000) tomaram posições oficiais refutando qualquer potencial conexão entre lesões endodônticas e subsequente eventos de saúde.

Nos últimos anos, o conceito de infecção focal, ou seja, efeitos sistêmicos de bactérias orais está mudando e depende, principalmente, da correlação entre periodontite crônica e doenças sistêmicas. Neste cenário, em 1996, no World Workshop in Periodontics realizado em Lansdowne (Virginia, EUA), Offenbacher introduziu o termo *medicina periodontal* como

disciplina, se concentrando na validação dessa relação e sua plausibilidade em estudos clínicos e com modelos animais (OFFENBACHER, 1996). Em julho de 1998, a American Academy of Periodontology (1998) entendeu a importância de disseminar o conhecimento de que as infecções orais podem exercer um papel importante em distúrbios que envolvem outras partes do corpo (SCANNAPIECO, 1998). Atualmente, é aceito que a condição oral está relacionada à saúde sistêmica, uma vez que a má saúde bucal pode ocorrer concomitantemente com doenças subjacentes mais graves e/ou pode predispor à doenças sistêmicas (SEYMOUR et al., 2007). A abordagem pioneira da medicina periodontal ajudou a renovar a atenção sobre a teoria da infecção focal e o aprofundamento da relação entre afecções bucais e saúde sistêmica (PIZZO et al., 2010).

3.1.6 A enzima Na^+K^+ -ATPase (NKA)

A bomba de sódio e potássio ou bomba de sódio, a NKA, é um membro da família de enzimas denominadas ATPases tipo P, que apresentam um estado intermediário fosforilado (JORGENSEN; HAKANSSON; KARLISH, 2003; KÜHLBRANDT, 2004). As ATPases tipo P são bombas de íons responsáveis por muitos processos fundamentais, variando desde a geração de potencial de membrana até a contração muscular e a remoção de íons tóxicos das células. Para tanto, utilizam a energia armazenada na molécula de adenosina trifosfato (ATP) e transportam íons específicos através da membrana da célula contra um gradiente de concentração. Além disso, são proteínas integrais de membrana, de múltiplos domínios transmembranares, com massas moleculares de 70-150kDa. O terminal carboxila e o terminal amina estão localizados no lado citoplasmático da membrana e todas têm um número idêntico de segmentos transmembranares. A homologia de sequências permite que a família de ATPases tipo P possa ser dividida em cinco membros, referidos como tipos I a V (GUEVARA, 2005).

As enzimas que criam e mantêm o potencial de membrana nas células animais e vegetais, resultante das diferentes concentrações iônicas em cada lado da membrana, são os membros mais investigados da família de ATPases tipo P. Tal gradiente de concentração iônica é um dos atributos mais indispensáveis das células viáveis e aciona o transporte secundário de aminoácidos e carboidratos, assim como de outros íons e pequenas moléculas. Todas as ATPases tipo P são proteínas integrais de membrana, de múltiplos domínios transmembranares, com massas moleculares de 70-150 kDa. Tanto o terminal carboxila como o terminal amina estão no lado citoplasmático da membrana, assim todas elas têm um número igual de segmentos transmembranares. Com base na homologia de sequências, a família de ATPases tipo P pode

ser dividida em cinco membros, referidos como tipos I a V. A NKA faz parte do membro II da família de ATPases tipo P, é responsável pelo transporte ativo de sódio e potássio em quase todas as células eucarióticas superiores e figura entre as mais investigadas (JORGENSEN, 1982; KÜHLBRANDT, 2004; RICE et al., 2001; SWEADNER; DONNERT, 2001).

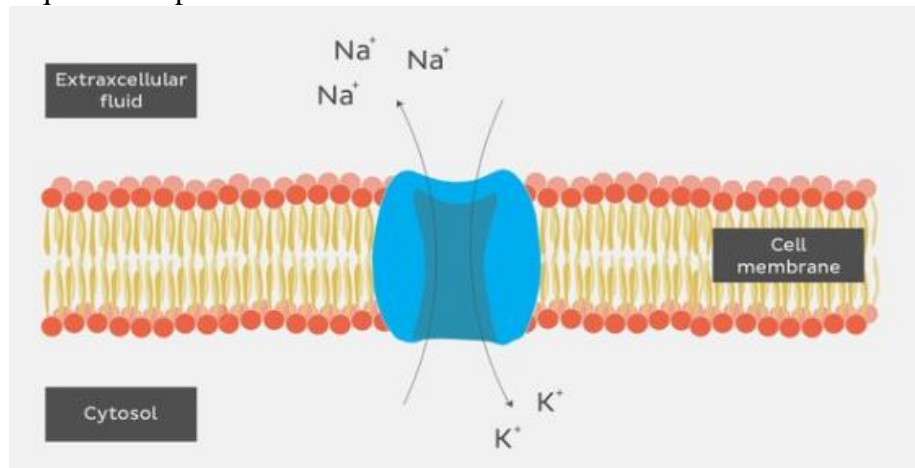
A vida animal precisa, necessariamente, da bomba de sódio para tornar-se possível. As células animais necessitam manter uma concentração elevada de potássio e uma concentração baixa de sódio no seu citoplasma em oposição as concentrações elevadas de sódio e baixas de potássio do seu ambiente extracelular. Descoberta pelo químico dinamarquês Jens Christian Skou (1957), a NKA cria gradientes de potencial eletroquímico para ambos os íons que são essenciais para funções celulares, como o transporte ativo secundário, a excitabilidade e a regulação de volume (APELL, 2014). Assim, a NKA mantém a homeostase dos íons, ou seja, é responsável pelo transporte ativo de íons sódio e potássio através da membrana plasmática com a finalidade de manter a sua excitabilidade (ONO et al., 2016; RIBEIRO et al., 2007).

A razão de Na^+/K^+ bombeada pela NKA é 3:2, ou seja, o ciclo da bomba estabelece a estequiometria de três sódios e dois potássios a cada uma molécula de ATP hidrolisado num mecanismo consecutivo ou do tipo ping-pong. Nesse processo, primeiro o sódio é bombeado para fora e, depois, o potássio é bombeado para dentro da célula. Esse ciclo foi compilado no Ciclo de Post-Albers (POST; HEGYVARY; KUME, 1972), que se tornou o protótipo do esquema de reação para todas as ATPases do tipo P (Figura 2). Devido a essa taxa de bombeamento, a NKA é considerada eletrogênica, o que significa que contribui diretamente para a separação de carga através da membrana (KARP, 2005). Interessantemente, os cátions apresentam um efeito dual: são capazes de ativar e de inativar o fluxo de prótons, dependendo da sua concentração. O sódio, por exemplo, reduz o fluxo de prótons em concentrações baixas e altas e, em concentrações intermediárias, promove-o (WANG; HORISBERGER, 1995).

Destacam-se como importantes funções fisiológicas da NKA, a sua influência sobre (I) o potencial de membrana, uma vez que a enzima é responsável pela manutenção do gradiente transmembranar de sódio e potássio que gera o potencial de repouso ou fornece energia para o potencial de ação de células excitáveis; (II) a manutenção de altas concentrações intracelulares de íons potássio (K^+), importantes para várias reações enzimáticas intracelulares, como a glicólise; (III) a regulação osmótica, pois um potencial de membrana negativo leva à menor concentração intracelular de ânions difusíveis que compensa o efeito osmótico de ânions intracelulares que não podem atravessar a membrana plasmática; (IV) o transporte ativo: o gradiente de sódio é usado como energia livre para o co-transporte de outras substâncias como

açúcares, aminoácidos, íons cloreto (Cl^-) e para conter o transporte de cálcio ou hidrogênio contra gradiente através da membrana celular (SKOU, 1988).

Figura 2 – Esquema simplificado da bomba de sódio



Fonte: Motifolio. Disponível em: <<http://www.motifolio.com>>. Acesso em: 08/2019

De todos os sistemas de transporte da membrana plasmática, a NKA é particularmente importante nas membranas basolaterais das células, uma vez que transporta prótons através dessas membranas (CANTLEY,1981). Estudos utilizando anticorpos monoclonais para as subunidades α e β da NKA mostraram que os osteoclastos são altamente enriquecidos de bombas de sódio (BARON et al., 1986). Cerca de 5 milhões de sítios de ligação nos osteoclastos foram observados, um número relativamente elevado em comparação com a maioria das outras células (BARON et al., 1986). Embora esse enriquecimento esteja relacionado a funções diferentes de reabsorção óssea, a literatura indica que a atividade da NKA é necessária para a reabsorção óssea. Dados de Baron et al. (1989) sugerem que a bomba de sódio dos osteoclastos é do tipo α_1 e se concentra, principalmente, na região basolateral do domínio da membrana plasmática. A ouabaína, um bloqueador da NKA, inibiu a liberação de cálcio de ossos longos fetais de ratos, bem como a formação de sítios de reabsorção em osteoclastos isolados (PRALLET et al., 1988). Neste contexto, a atividade da NKA afeta diretamente a concentração extracelular de cálcio, o qual desempenha um papel importante na formação de múltiplas conexões entre as células e na manutenção da função normal das células (MA et al., 2000).

A atividade da NKA pode ser regulada por vários mecanismos, os quais influenciam o funcionamento da enzima em diferentes condições, tornando-a vulnerável a ataques patológicos (KONG et al., 2017; MI et al., 2010; SARTORI et al., 2017). Esses mecanismos reguladores tornam a enzima alvo potencial para tratamentos terapêuticos de diferentes patologias (PATEL

et al., 2016). Ademais, além da sua dependência do ATP, a atividade da NKA também pode ser regulada pelo estado de fosforilação, por substâncias endógenas como a ouabaína, neurotransmissores como a norepinefrina (estimulador) e a dopamina (inibidor), e por hormônios como a insulina (estimulador)(YU, 2003), entre outros. Alguns estudos demonstram que a NKA é altamente vulnerável à ação dos radicais livres (KURELLA et al., 1997; LEES, 1993; YOUSEF et al., 2002) e muito sensível a agentes oxidantes (CARFAGNA; PONSLER; MUHOBERAC, 1996; FOLMER et al., 2004), relacionando o estresse oxidativo e a função dessa enzima através de alterações observadas em sua atividade decorrente da peroxidação lipídica (KAUR; SHARMA; SINGH, 2001; PIERRE et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2011; 2012).

Quadros infecciosos também interferem na atividade da NKA. Estudos envolvendo infecção pelo vírus Herpes simples (MI et al., 2010; SCHAEFER et al., 1982) e pela bactéria *Aeromonas hydrophila* (KONG et al., 2017) mostraram uma redução na atividade da NKA, embora o exato mecanismo ainda não esteja esclarecido. Sartori et al. (2017) demonstraram um aumento da atividade da NKA renal em camundongos infectados com Herpes simples, sugerindo que essa infecção viral interfere na permeabilidade das membranas celulares aos íons. Assim, o referido estudo sugere que o aumento da atividade da NKA causada pela infecção seja uma tentativa de equilibrar a função renal. Além disso, a atividade aumentada da NKA tem sido relacionada a interações no sítio de ativação da enzima, conferindo proteção à sua atividade enzimática e parece não alterar a afinidade da enzima ao sódio, nem ao K^+ (XU et al., 2005).

A redução da atividade da NKA cardíaca provoca disfunção contrátil, gera arritmias e insuficiência cardíaca (SCHWINGER et al., 2003). Assim, o aumento ou a normalização da atividade da NKA no coração, através de intervenções nutricionais ou farmacológicas, podem ser responsáveis pela atenuação da hipertrofia cardíaca e remodelação. A NKA é a principal bomba para o transporte ativo de íons e, portanto, desempenha um papel importante no controle da função elétrica e contrátil do miocárdio (KHATUA et al., 2017). O aumento da atividade da NKA mostrou atenuar a cardiomiopatia lipotóxica através da supressão da inflamação sistêmica e da acumulação de ácidos graxos livres (GUO et al., 2016; OBRADOVIC, 2014; QIN et al., 2016).

De um modo geral, a atividade aumentada da NKA pode alterar a transmissão celular e reduzir a entrada de cálcio na célula. Por sua vez, a sua inativação leva a uma despolarização parcial da membrana e a uma sucessiva entrada de cálcio nas células, podendo culminar em excitotoxicidade (BEAL; HYMAN; KOROSHETZ, 1993). Assim, *cada órgão responde de maneira* específica à ativação ou à inativação da NKA, ou seja, essa resposta é característica de

cada tecido (BELLIARD et al., 2016; HUANG et al., 2017; VAGUE et al., 2004; VENUGOPAL et al., 2017).

3.1.7 A enzima Ca^{2+} -ATPase (CAA)

O cálcio é, provavelmente, o mais importante entre todos os mensageiros intracelulares nos mecanismos de tradução de sinal em células eucarióticas. Seu funcionamento como um mensageiro é garantido pela capacidade da célula para manter, em virtude de seus diferentes mecanismos homeostáticos, uma concentração citoplasmática desse cátion abaixo da sua concentração extracelular (CARAFOLI, 1987). Dessa forma, se não fosse bombeado para o meio extracelular, o cálcio precipitar-se-ia no interior da célula, principalmente com os abundantes fosfatos e ácidos orgânicos, o que impossibilitaria os processos realizados no citoplasma. A solução consiste na manutenção de uma membrana muito impermeável ao cálcio e a existência simultânea de mecanismos de transporte altamente específicos, tanto para sua exclusão ativa para o ambiente extracelular, quanto para o armazenamento em organelas específicas. Como um cátion bivalente, o cálcio é fortemente atraído para dentro da célula em virtude da diferença no potencial elétrico transmembrana negativo no interior (BENAIM, 2004).

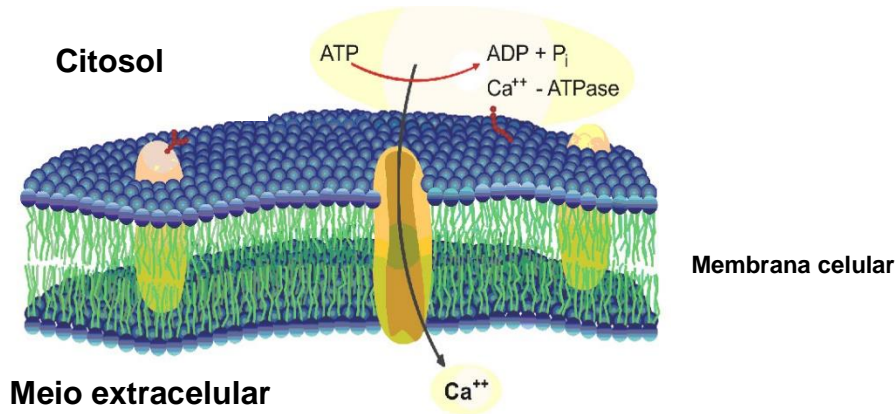
Os íons cálcio são importantes mediadores também da lesão celular. Diversas doenças como a isquemia, e xenobióticos certas toxinas causam um aumento inicial da concentração de cálcio no citosol devido ao influxo de cálcio através da membrana plasmática, e liberação de cálcio das mitocôndrias e do retículo endoplasmático. Esse aumento intracelular de cálcio, por sua vez, ativa várias enzimas que possuem ações celulares deletérias em potencial, como as fosfolipases e as endonucleases. Além disso, o aumento dos níveis intracelulares de cálcio está relacionado ao aumento da permeabilidade mitocondrial e indução de apoptose. Ou seja, o cálcio pode entrar na célula pela ruptura de membrana plasmática através da ativação da fosfolipase A_2 ou da peroxidação lipídica induzidas pelas EROs. O aumento da geração das EROs leva à lesão dos componentes celulares, inclusive da membrana plasmática, e os produtos de degradação dos lipídios membranares levam à perda da permeabilidade seletiva da membrana que culmina no aumento do influxo de cálcio para o interior da célula. As consequências da maior concentração de cálcio parecem ser mediados pelas EROs. Tudo isso leva à uma inibição de enzimas celulares, desnaturação de proteínas e alterações citológicas características da necrose. Concluindo, o distúrbio homeostático do cálcio na célula pode conduzir a processos autocatalíticos. O cálcio pode, também, ativar proteases sensíveis,

estimulando a degradação de estruturas proteicas, bem como afetando o processo de respiração mitocondrial (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010).

A CAA ou bomba de cálcio faz parte da família das ATPases do tipo P, assim definidas pela formação de um intermediário fosforilado durante a ciclo catalítico, que mantém a homeostase intracelular do cálcio, exportando-o do citoplasma para o espaço extracelular, garantindo a regulação dos seus baixos níveis citoplasmáticos (BRINI, 2009; DI LEVA et al., 2008)(Figura 3). A estequiometria da bomba de cálcio da membrana plasmática transporta um átomo de cálcio para cada molécula de ATP que hidrolisa (CARAFOLI, 1987). É interessante mencionar que, embora a Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática seja altamente onipresente entre os organismos eucarióticos, existem diferenças entre as bombas de cálcio em diferentes organismos. Por exemplo, a CAA do parasita patogênico *Trypanosoma brucei*, que causa a doença do sono, embora tenha um peso molecular aparentemente semelhante ao da enzima homóloga humana, é inibida pela pentamidina, droga utilizada no tratamento da doença, enquanto essa droga não tem nenhum efeito na CAA de humanos (BENAIM et al., 1993). A bomba de cálcio também mostra similaridades estruturais entre diversas espécies (GEISLER et al., 2000). Há duas categorias de CAA: um tipo, que é comum a todos os organismos celulares, tem uma forte especificidade por ATP e não é influenciada por calmodulina (CaM); o outro tipo, que é exclusivo de eucariontes, pode usar guanosina trifosfato (GTP) ou iosina trifosfato (ITP) em adição ao ATP e é regulada pela CaM. Em animais, o primeiro tipo é restrito ao retículo endoplasmático ou retículo sarcoplasmático, e o segundo, à membrana plasmática, enquanto plantas têm ambos os tipos no retículo endoplasmático e na membrana plasmática. Além de seu papel como uma bomba de cálcio, a CAA da membrana plasmática também pode funcionar como uma molécula de sinalização (BUCH et al., 2005; CARTWRIGHT et al., 2009).

A CAA da membrana plasmática é estimulada pela CaM. Assim, quando os níveis de cálcio aumentam intracelularmente, como resultado da abertura de um canal dependente de voltagem ou dependente de ligante, esse cátion se liga à CaM que muda sua conformação e modifica a atividade das enzimas, que por sua vez desencadeia uma reação celular ao sinal. Posteriormente, o complexo Ca^{2+} -CaM estimula a bomba de cálcio da membrana plasmática, levando à diminuição da concentração de cálcio citoplasmático em seu nível de repouso, preparando a célula para responder a um novo sinal (BENAIM, 1993; CARAFOLI, 1987). O CaM possui 4 sítios de ligação para o cálcio (BENAIM; VILLALOBO, 2002) e a conformação da proteína depende estritamente de quantos átomos de cálcio estão ligados, o que a transforma em um “sensor” da concentração citoplasmática de cálcio (BENAIM et al., 1991; BENAIM; VILLALOBO, 2002).

Figura 3 – Esquema simplificado da bomba de cálcio (Ca^{2+} -ATPase)



Fonte: Motifolio. Disponível em: <<http://www.motifolio.com>>. Acesso em: 08/2019

A atividade da CAA também pode ser aumentada por autoagregação, o que sugere que a enzima pode ter uma transição de monômero para dímero (COELHO-SAMPAIO et al., 1991). Solventes orgânicos como dimetilsulfóxido e poliálcoois (etilenoglicol, glicerol) também simulam o efeito estimulador do CaM (BENAIM; de MEIS, 1989; 1990). O etanol e outros álcoois alifáticos de cadeia curta estimulam a CAA de eritrócitos humanos, tanto na sua forma purificada quanto na enzima *in situ* (BENAIM, 1994). A CAA da membrana plasmática também pode ser estimulada por fosfolipídios e ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (CARAFOLI, 1987). Já foi demonstrado que a proporção de fosfatidilserina presente na face interna da membrana plasmática é suficiente para estimular 50% da atividade da enzima. Também pode ser estimulado por fosforilação por diferentes proteínas quinases, quanto à proteína quinase A (CARAFOLI, 1992) e proteína quinase C (ROMERO; ROMERO, 1984).

Em 1990, Bekker e Gay caracterizaram a CAA na membrana plasmática de osteoclastos (BEKKER; GAY, 1990) e o controle das concentrações de cálcio extracelular e intracelular é crucial para o desenvolvimento e função adequados dessas células (LORGET et al., 2000; NOWYCKY; THOMAS, 2002). Durante a diferenciação dos osteoclastos, as concentrações de cálcio citosólico mostram um padrão oscilatório (ASAGIRI et al., 2005; TAKAYANAGI et al., 2002). Osteoclastos maduros absorvem vastas quantidades de cálcio acompanhadas por produtos orgânicos de degradação óssea durante a reabsorção. Como o excesso de íons cálcio é tóxico para os osteoclastos, a sobrevivência dos osteoclastos é assegurada pela extrusão de cálcio no espaço extracelular circundante via transcitose (SALO et al., 1997) ou certos transportadores de cálcio (MOONGA et al., 2001; LI et al., 2007). Experimentalmente foi demonstrado que a expressão das isoformas 1 e 4 da CAA da membrana plasmática pode ser

aumentada durante a fase tardia da diferenciação dos osteoclastos (BRINI, 2009; DI LEVA et al., 2008).

3.2 JUSTIFICATIVA

Considerando que a NKA e a CAA são sensíveis ao status oxidativo celular (CHOUDHARY; BODAKHE, 2016; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010), que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese da lesão periapical (DEZEREGA et al., 2012; INCHINGOLO et al., 2014; MINCZYKOWSKI et al., 2001) e que a relação entre o estresse oxidativo, as atividades da NKA, da CAA e periodontite apical ainda não foi estabelecida, o presente estudo investigou a influência da periodontite apical sobre parâmetros de estresse oxidativo e sobre as atividades de ATPases em diferentes órgãos de ratos adultos e jovens.

3.3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

3.3.1 Manuscrito 1 – Apical periodontitis induces changes on oxidative stress parameters and increases Na⁺/K⁺-ATPase activity in adult rats.

Title page**Apical periodontitis induces changes on oxidative stress parameters and increases Na⁺/K⁺-ATPase activity in adult rats.**

Raquel Cristine Silva Barcelos^a, Higor Zuquette Rosa^c, Karine Roversi^c, Camilla dos Santos Tibúrcio-Machado^a, Paula Tassoni Inchaki^b, Marilise Escobar Burger^c, Carlos Alexandre Souza Bier^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Rua Marechal Floriano Peixoto, 1184, Centro, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^bResidência Multiprofissional em Saúde da Família e Comunidade, Av. Francisco Trein, 596, bairro Cristo Redentor, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Cidade Universitária, Camobi, Santa Maria, RS, Brazil.

The authors deny any conflicts of interest.

Corresponding author

Raquel Cristine Silva Barcelos (Ph.D)
Dental Sciences Post Graduation Program
Federal University of Santa Maria (UFSM)
97105-900 Santa Maria (RS) Brazil
raquel.barcelos@hotmail.com

Abstract

Introduction: Endodontic infection can cause systemic alterations. The involvement of oxidative stress (OS) and transmembrane enzymes compose the pathogenesis of various systemic diseases. However, the relation among apical periodontitis (AP), OS parameters and Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) pump is not reported in the literature. This study evaluated the AP influence on OS parameters and NKA activity in adult rats. **Methods:** Adult male Wistar rats were randomly assigned to two experimental groups: control (CT group; n=8) and AP (AP group; n=9), which was induced on the first right mandibular molar tooth. After 21 days of AP induction, mandibles were dissected for radiographic analysis. In addition, heart, liver, pancreas and kidney were collected for analysis of endogenous OS parameters and NKA activity. Data were analyzed by Student's T-test. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant for all comparisons made. **Results:** AP increased RS levels only in the heart while the other analyzed organs did not have this parameter modified. Heart and pancreas had a decreased endogenous antioxidant system (catalase activity and vitamin C levels), liver and kidney had an increased one. AP increased NKA activity in the heart, liver and pancreas, but not in the kidney. **Conclusion:** The modulation of both endogenous antioxidant defense system and NKA activity in vital organs suggested that alterations in the antioxidant status and cellular electrochemical gradient may be involved in the AP pathophysiology.

Keywords: periapical lesion, sodium pump, antioxidant defense system, endodontic lesion, oral-systemic relationship

Introduction

Apical periodontitis (AP) results from untreated dental caries and it is characterized by inflammation and destruction of periradicular tissues induced by the dental pulp space microbial infection¹. Regarding AP, neutrophils from peripheral blood show high reactive oxygen species (ROS) production, which is a host defense mechanism against the invading pathogen² and represents an important pathogenic mechanism for diseases that present phagocytic infiltration and bone resorption³. AP increased systemic inflammatory markers (Samuel et al., 2018), which may cause oxidative stress (OS)⁵. This characteristic triggers a systemic immune response and impairs remote organs consequently affecting the overall health of patients⁵. Cells normally have regulatory protective mechanisms against OS⁶. These mechanisms are activated by the production of cytoprotective agents that scavenge ROS, for example, the endogenous antioxidant system⁷. ROS can directly induce cytotoxic effects and oxidative damage to lipids, proteins and DNA besides interfering in cell growth and cell cycle progression⁸. It also induces apoptosis⁹ and causes matrix degradation via the induction of matrix proteinases. Besides, ROS indirectly acts as an intracellular signaling molecules during osteoclastogenesis, which is an important process in hard tissue degeneration¹⁰.

The sodium pump (Na^+K^+ -ATPase; NKA), a P-type ATPase, is a transmembrane enzyme responsible for the active transport of sodium (Na^+) and potassium (K^+), which plays a key role in controlling homeostasis and cellular electrochemical gradients in almost all higher eukaryotic cells and has been extensively investigated¹¹. Recently, a signaling function for NKA was discovered, as well as its involvement in systemic diseases such as obesity, diabetes, dyslipidemia and atherosclerosis. Such conditions are related to OS, characterizing an imbalance between oxidant and antioxidant agents¹². However, this relationship has never been reported in AP. Considering this context, the objective of this study was to evaluate the AP influence on OS parameters and its relation to NKA activity in different adult rats' organs.

Materials and methods

Animals

Adult male Wistar rats (sixteen weeks old) were housed in groups of four (± 1) animals per Plexiglas® cages with free access to standard chow (Supralab®, Alisul Alimentos LTDA, Brazil) and tap water in a room with controlled temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) on a 12h light/dark cycle. Before starting the experimental protocol, the animals underwent a 7-day acclimatization period. The Animal Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (CEUA:

7021190117), which is affiliated to the Council of Animal Experiments (CONCEA), following international norms of animal care and maintenance, approved all procedures.

Apical periodontitis induction protocol

The animals were randomly divided in two experimental groups: control (CT group; no AP; n=8); apical periodontitis (AP group; n= 9). AP was induced in animals of the AP group by pulp occlusal exposure of the first mandibular right molars. The pulp exposure was performed under anesthesia (ketamine/xylazine, 70 and 6 mg/kg, intramuscular injection, respectively) with a spherical bur 1011HL (KG Sorensen® Ind. Com. Ltda, Brazil) at high speed, under constant irrigation. The pulp chambers were left exposed to the oral environment for 21 days to allow AP establishment. Intact right mandibular first molars were used as controls (CT group)¹³ (Figure 1).

Samples preparation

After 21 days of endodontic access, animals were euthanized by cardiac puncture and heart, liver, kidney and pancreas were collected. For all biochemical assays, the tissues were homogenized in TrisHCl buffer (10mM; pH 7.4) and centrifuged at 3640g for 15min. The supernatants were used for biochemical analysis. The jaws were removed and submitted to radiographic shots for analyzed for presence of periapical lesion in the CT group.

Biochemical assessments

Tissue reactive species (RS) levels estimation

The RS levels were quantified using the oxidant sensing fluorescent probe, 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA, Sigma Aldrich®, Brazil)¹⁴. The oxidation (DCHF-DA) to dichlorofluorescein (DCF) was determined at 488nm for excitation and 525nm for emission. Tissues samples were incubated for 1h until the fluorescence measurement. DCF-RS levels were expressed as percentage of CT group.

Tissue antioxidant defenses estimation

Catalase (CAT) activity was spectrophotometrically quantified monitoring the H₂O₂ disappearance (Proquímios®, Brazil) in the presence of homogenate at 240nm¹⁵. The enzymatic activity was expressed in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{g tissue}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Vitamin C (VIT C) was estimated as described by Galley et al.¹⁶. This method produces an orange chromogen by the reaction with dinitrophenylhydrazine at 37°C, spectrophotometrically measured at 520nm. A standard curve using ascorbic acid was used to calculate the VIT C content and it was expressed as mg ascorbic acid.g tissue⁻¹.

Tissue NKA activity estimation

NKA activity assay was adapted from Muszbek et al.¹⁷. The method is based on inorganic phosphate (Pi) released by ATP (Sigma Aldrich®, Brazil) hydrolysis. The formed molybdate-Pi complexes were spectrophotometrically measured at 405nm. Values were calculated in relation to standard curve constructed with Pi at known concentrations and corrected by protein.

Statistical analysis

Data were analyzed by Student's T-test. All data are expressed as means ± standard error of the mean (SEM). Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant for all performed comparisons.

Results

AP influence on RS levels and antioxidant defenses in vital organs of rats (Table 1)

AP increased RS levels only in the heart. This parameter was not modified in the liver, pancreas and kidney in relation to CT group.

AP group showed decreased levels of VIT C, but no changes in CAT activity in the heart compared to CT group. In the liver, AP increased CAT activity, while no alteration in VIT C levels was observed in relation to CT group. In the pancreas, AP group showed decreased CAT activity and no changes in VIT C levels were observed in comparison to CT group. On the other hand, AP increased CAT activity and VIT C levels in the kidney in relation to CT group.

AP influence on NKA activity in vital organs of rats (Figure 2)

Regarding the AP group, NKA activity was increased in the heart, liver and pancreas, but not in the kidney when compared to CT group.

Discussion

Recent systematic review and meta-analysis suggests an association between chronic AP and adverse systemic outcomes¹⁸. It has been reported that the OS is related to AP pathogenesis affecting the overall health of patients⁵. In addition, alterations in the NKA activity might be involved in the pathogenesis of several systemic diseases affecting different organs and systems. To the best of our knowledge, this study is a novel in evaluating the AP influence on OS parameters and NKA activity in the heart, liver, pancreas and kidney of rats. Our findings showed that the experimental AP model induced: (i) increase RS levels in the heart, (ii) changes in antioxidant system, as VIT C levels in heart and kidney and CAT activity in liver, pancreas and kidney. Besides, (iii) the NKA activity in the heart, liver and pancreas was increased.

The OS resultant from high ROS generation has demonstrated a positive association with AP⁵. However, studies about the role of endogenous antioxidant defense systems in the endodontic pathology are still scarce in literature. In the current study, AP was related to modulations in the antioxidant system, represented in this work by CAT and VIT C. Both heart and pancreas showed decreased VIT C levels and CAT activity, respectively. The liver showed increased CAT activity, while an increase in CAT activity and VIT C levels were observed in the kidney. Accordingly, VIT C serum levels were increased in patients with periapical inflammation¹⁹. Periapical lesion is related to changes in reduced glutathione levels in blood of rats as well²⁰. In this study, the reduction in cardiac and pancreatic CAT activities and its increase in the liver and kidney demonstrated amplification and its consumption in the hydrogen peroxide detoxification generated through the conversion of superoxide by superoxide dismutase, critical cytoprotective enzymes for the RS scavenging¹⁰. Based on our findings, it is believed that the modulation of VIT C levels and CAT activities, as observed in the AP group, may be related to an attempt of this antioxidant defense to counteract high RS. These RS was locally generated during the inflammatory response because it is one of polymorphonuclear leukocyte defense mechanisms against the pathogenic microflora related to AP⁴³. These findings confirm that the recruitment of endogenous antioxidant defense system is an important protection strategy against oxidative damages related to AP. Maintaining a balance between RS and antioxidants is essential for apical health. However, the endogenous antioxidants evaluated in this study did not contain the high generation of cardiac RS induced by AP demonstrating the fragility of this organ against endodontic infection. In this context, our results demonstrate that AP determines systemic OS. This condition can compromise the overall health of patients and significantly contributes to the pathogenesis of severe systemic diseases increasing the risk

factor of individuals with AP. Our findings corroborate with the previous study of Inchingolo et al.⁵, which demonstrated a positive association between chronic AP and OS, i.e., individuals affected by chronic AP are exposed to OS, which is hazardous to overall health.

Interestingly, AP was able to affect NKA activity in the heart, liver and pancreas, indicating the imbalance of electrochemical gradients across the plasmatic membrane of these organs. NKA is a validated target for the regulation of various cardiac conditions²² due to its regulatory role in the secretion of cytokines as the systemic biomarker interleukin 1 β and C-reactive protein²³. NKA increased activity was related to reduced lipotoxic cardiomyopathy through the suppression of systemic inflammation and fatty acids accumulation^{24,25}. It was further reported that the increased NKA activity can stimulate NKA downstream signal pathway, consequently regulating cardiac contractility and alleviating myocardial cell injury^{26,27}. In line with this, an NKA activator was able to protect myocardial cells against high glucose-induced cell injury and apoptosis through ROS level reduction, inhibition of lipid peroxidation, reduction of Ca²⁺ overload, among others²⁸. Thus, we suggest that the increasing in AP-induced NKA activity is an attempt of the heart to protect itself against harmful effects induced by the endodontic infection.

Considering the liver, NKA activity was increased in the AP group in relation to CT group. Therefore, AP may increase the NKA activity, which may be related to the matrix volume stability maintenance, preventing intracellular calcium overload and inhibiting ischemia and hypoxia exerting liver protective effects. NKA regulates the cellular volume and aids the maintenance of a resting potential²⁹.

Sequentially, the pancreas of AP group also exhibited an increased NKA activity. This finding may be related to the removal of extra-cellular Na⁺ or an increase in K⁺, which are manipulations that stimulate the pump, culminating in the hyperpolarization and reduction of the electrical activity³⁰. NKA activation may be a consequence of membrane depolarization by AP presence. Furthermore, the pump activation was shown in inflammatory conditions³¹. Therefore, in this study, we suggest that an increased NKA activity in the pancreas was caused by endodontic lesion-induced inflammatory process.

However, our findings showed no alterations in renal NKA activity of the AP group. The most of the filtered Na⁺ in the kidney is actively reabsorbed in the proximal tubules by different transporters present in the apical membrane. The electrochemical conditions required for the energetically favorable Na⁺ transport, generated by basolateral NKA, became this a possible process³². NKA is a central regulator of kidney functions and a bacterial infection has

been shown to result in an alteration of the cell membrane permeability to ions³³ but this was not observed in this study.

NKA activity depends on Na⁺ coordinated effect on the cytoplasmic side and on K⁺ coordinated effect on the extracellular side of the plasmatic membrane in ATP presence. NKA acts by increasing the ATP hydrolysis rate for Na⁺/K⁺ active transport and body living processes depend on it. This NKA catalytic function can be accelerated when antibody-antigen interaction occurs at an activation site of the enzyme. The main NKA activation hallmark is the increase in the turnover ATP hydrolysis rate and Na⁺/K⁺ active transport. Moreover, NKA activation clearly protects enzyme activity against natural denaturing process²⁶, as observed in the presence of a pathological process³⁴. It also affects cellular activities by regulating intracellular Ca²⁺ transients²⁶. However, no significant changes of the Na⁺ and K⁺ affinity ratio were detected during the NKA activation, suggesting that the enzymatic mode for Na⁺/K⁺ ion transporting system is the same observed in normal enzyme state²⁶. The damage induced by AP may increase NKA activity and contributes to reduce ion loss, thus maintaining Na⁺ ion homeostasis³⁵.

Our results showed that AP increased NKA activity in the heart, liver and pancreas besides being able to exert a modulatory role in the antioxidant defense system of these tissues. Based on this study, we suggest that NKA activation preserved the integrity and functionality of the enzyme minimizing the harmful systemic effects related to AP. Currently, no study showing the AP influence on NKA activity and antioxidant system defense in different tissues, more exactly in the heart, liver, pancreas and kidney was found in the literature. From this study, we suggest that a cellular electrochemical gradient alteration may be involved in the periapical lesion physiopathology, thus modulating the NKA activity and the endogenous antioxidant defense.

Acknowledgments

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

References

1. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992;18:427-30.
2. Chapple IL. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol* 1997;24:287-296.
3. Zaragoza C, López-Rivera E, García-Rama C, Saura M, Martínez-Ruíz A, Lizarbe TR et al. Cbfa-1 mediates nitric oxide regulation of MMP-13 in osteoblasts. *J Cell Sci* 2006;119:1896-1902.
4. Samuel RO, Gomes-Filho JE, Azuma MM, Sumida DH, Oliveira SH, Chiba FY et al. Endodontic infections increase leukocyte and lymphocyte levels in the blood. *Clin Oral Investig* 2018;22:1395-401.
5. Inchingolo F, Marrelli M, Annibali S, Cristalli MP, Dipalma G, Inchingolo AD, et al. Influence of endodontic treatment on systemic oxidative stress. *Int J Med Sci* 2014;11:1-6.
6. Furukawa-Hibi Y, Kobayashi Y, Chen C, Motoyama N. FOXO transcription factors in cell-cycle regulation and the response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7:752-60.
7. Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 1999;15:D339-45.
8. Chang D, Zhang X, Rong S, Sha Q, Liu P, Han T, et al. Serum Antioxidative Enzymes Levels and Oxidative Stress Products in Age-Related Cataract Patients. *Oxid Med Cell Longev* 2013;7 pages.
9. Yu JY, Lee SY, Son YO, Shi X, Park SS, Lee JC. Continuous presence of H₂O₂ induces mitochondrial-mediated, MAPK- and caspase-independent growth inhibition and cytotoxicity in human gingival fibroblasts. *Toxicol in Vitro* 2012;26:561-570.
10. Kanzaki H, Wada S, Narimiya T, Yamaguchi Y, Katsumata Y, Itohiya K, et al. Pathways that regulate ROS scavenging enzymes, and their role in defense against tissue destruction in periodontitis. *Front Physiol*, 2017;8:351.
11. Sweadner KJ, Donnert C. Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem J* 2001;356:582-589.
12. Yan Y, Shapiro JI. The physiological and clinical importance of sodium potassium ATPase in cardiovascular diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2016;27:43-49.
13. Wolle CFB, Zollmann LA, Bairros PO, Etges A, Leite CE, Morrone FB, et al. Outcome of periapical lesions in a rat model of type 2 diabetes: refractoriness to systemic antioxidant therapy. *J Endod* 2013;39:643-7.
14. Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. (1999) Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-carboxy-2'-7'-

- dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine. *Free Rad Biol Med* 1999;27:146-159.
15. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 1984;105:121-126.
16. Galley H, Davies MJ, Webster NR. Ascorbil radical formation in patients with sepsis: effects of ascorbate loading. *Free Rad Biol Med* 1996;20:139-143.
17. Musbek L, Szabó T, Fésus L. A highly sensitive method for the measurement of ATPase activity. *Anal Biochem* 1977; 77:286-288.
18. Gomes MS, Blattner TC, Sant'Ana FM, Grecca FS, Hugo FN, Fouad AF, et al. Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? A systematic review and meta-analysis. *J Endod* 2013;39:1205-17.
19. Shetty P, Kumari S. Serum total anti-oxidants, superoxide dismutase (SOD), myeloperoxidase and vitamin C levels in periapical inflammation. A original study. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 2012;3:934-939.
20. Berar AM, David DC, Lascu L, Matros L, Campian RS. Analysis of hematological and oxidative stress parameters in the evaluation of experimentally induced periapical lesions. *Hum Vet M* 2015;7:162-167.
21. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol* 2000 2007;43:160-232.
22. Sehirli AÖ, Tetik S, Yiğiner Ö, Cetinel S, Özkan N, Akkiprik M, et al. OP-022 alterations in cardiac Caveolin-3 expression and Na/K ATPase activity in rats with myocardial infarction are reversed by resveratrol. *Am J Cardiol* 2015;115:S8.
23. Qin H, Zhang Y, Wang R, Du X, Li L, Du H. Suppresses Na⁺-K⁺-ATPase-mediated systemic inflammation and CD36 expression, and alleviates cardiac lipotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *J Cardiovasc Pharmacol* 2016;68:465-472.
24. Guo N, Ai W, Jiang X, Ren Y, Tian G, Xue X. Low-dose Exogenous Ouabain alleviates cardiac lipotoxicity through suppressing expression of CD36. *J Cardiovasc Pharmacol* 2016;67:39-46.
25. Obradovic M, Stewart AJ, Pitt SJ, Labudovic-Borovic M, Sudar E, Petrovic V, et al. *In vivo* effects of 17 β -estradiol on cardiac Na⁺/K⁺-ATPase expression and activity in rat heart. *Mol Cell Endocrinol* 2014;388:58-68.
26. Xu KY. Activation of (Na⁺K⁺)-ATPase. *Biochem Biophys Res Com* 2005;338:1669-1677.
27. Zheng J, Koh X, Hua F, Li G, Larrick JW, Bian JS. Cardioprotection induced by Na(+)/K(+)-ATPase activation involves extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Cardiovasc Res* 2011;89:51-59.

28. Yan X, Xun M, Dou X, Wu L, Zhang F, Zheng J. Activation of Na⁺-K⁺-ATPase with DRm217 attenuates oxidative stress-induced myocardial cell injury via closing Na⁺-K⁺-ATPase/Src/Ros amplifier. *Apoptosis* 2017;22:531-543.
29. Huigsloot M, Tijdens IB, Mulder GJ, van der Water B. Differential regulation of doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis by Bcl-2 in mammary adenocarcinoma (MTLn3) cells. *J Biol Chem* 2002; 277:35869-35879.
30. Ribalet B, Beigelman PM. Effects of sodium on beta-cell electrical activity. *Am J Physiol* 1982;242:C296-C303.
31. Sweeney G, Klip A. Regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase by insulin: why and how? *Mol Cell Biochem* 1998;182:121-133.
32. Arnaud-Batista FJ, Peruchetti DB, Abreu TP, do Nascimento NR, Malnic G, Fonteles MC, et al. Uroguanylin modulates (Na⁺-K⁺)ATPase in a proximal tubule cell line: Interactions among the cGMP/protein kinase G, cAMP/protein kinase A, and mTOR pathways. *Biochim Biophys* 2016;1860:1431-1438.
33. Kong WG, Li SS, Chen XX, Huang YQ, Tang Y, Wu ZX. A study of the damage of the intestinal mucosa barrier structure and function of *Ctenopharyngodon idella* with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Physiol Biochem* 2017; 43:1223-1235.
34. Sartori G, Jardim NS, Sari MH, Flores EF, Prigol M, Nogueira CW. Diphenyl diselenide reduces oxidative stress and toxicity caused by HSV-2 infection in mice. *J Cell Biochem* 2017;118:1028-1037.
35. Moyson S, Liew HJ, Diricx M, Sinha AK, Blust R, De Boeck G. The combined effect of hypoxia and nutritional status on metabolic and ionoregulatory responses of common carp (*Cyprinus carpio*). *Com Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol* 2015;179:133-1.

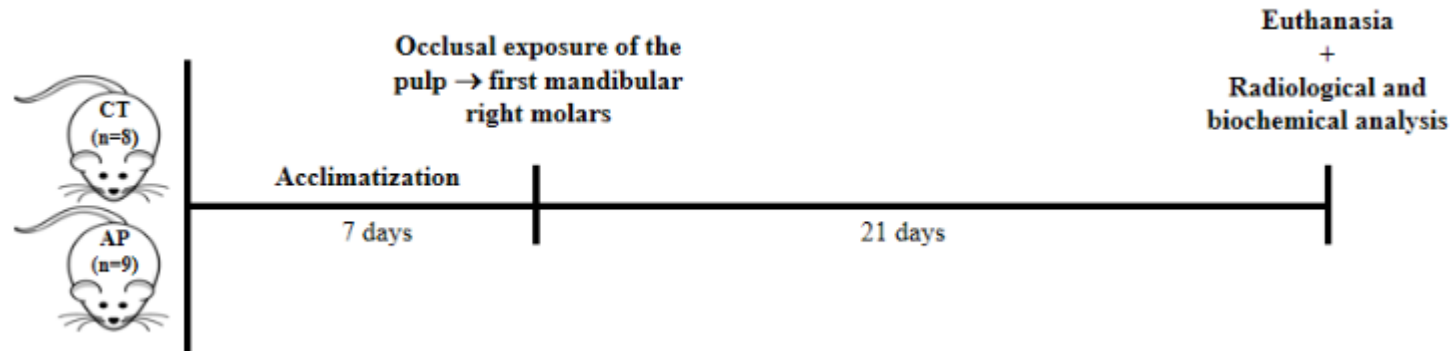
Captions

Figure 1 – Experimental design. CT: control group (n=8). AP: apical periodontitis group (n=9).

Figure 2 – Apical periodontitis (AP) influence on Na⁺K⁺-ATPase (NKA) activity in different vital organs of adult rats. Data expressed as means±SEM. (A) Heart; (B) Liver; (C) Pancreas, (D) Kidney *Indicates significant difference of CT group ($P<0.05$). CT: control group (n=8). AP: apical periodontitis group (n=9).

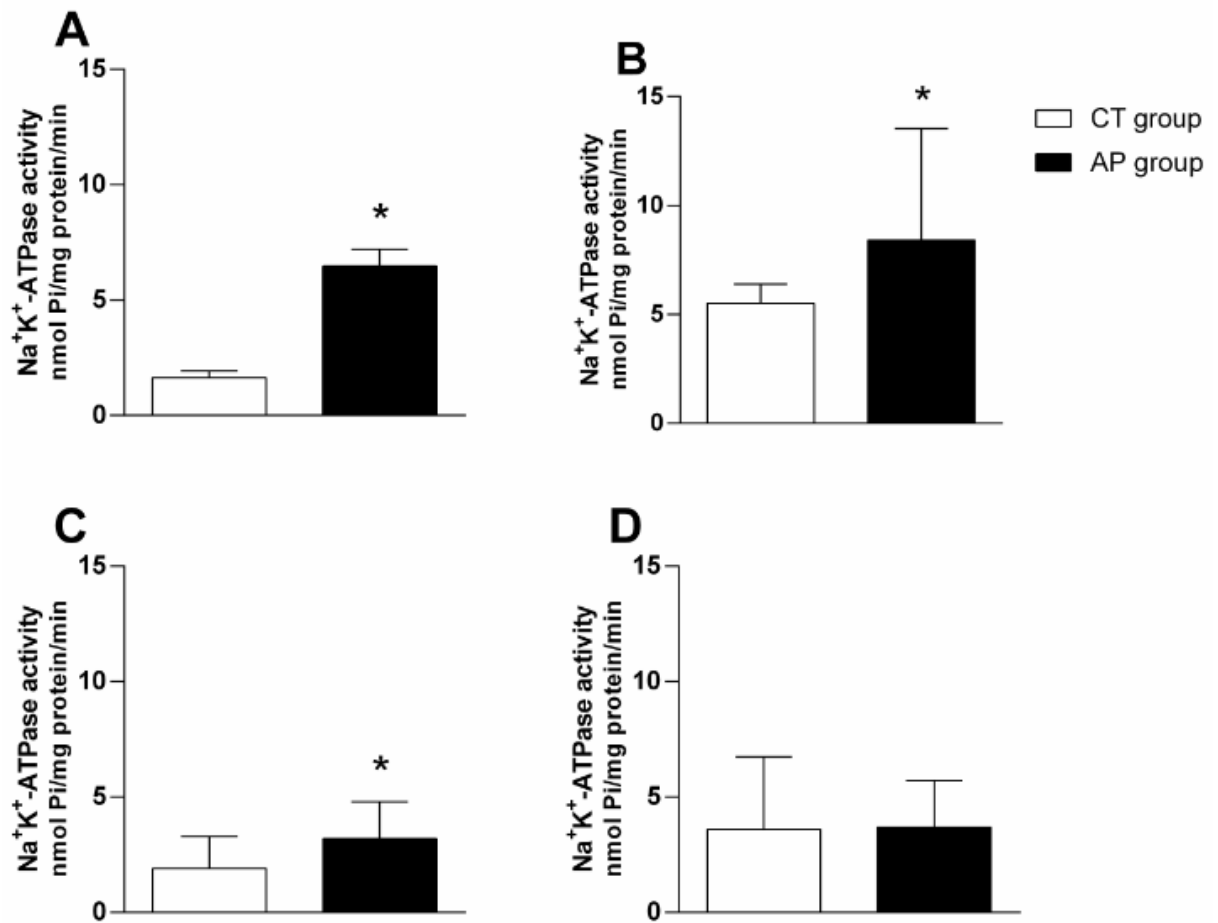
Table 1 – Influence of apical periodontitis (AP) on reactive species (RS) levels, catalase (CAT) activity and vitamin C (VIT C) levels in different tissues of rats. Data expressed as means±SEM. *Indicates significant difference from CT group ($P<0.05$). CT: control group (n=8). AP: apical periodontitis group (n=9).

Figure 1 – Experimental design



CT: control group (n=8). AP: apical periodontitis group (n=9).

Figure 2 – Apical periodontitis (AP) influence on Na^+K^+ -ATPase (NKA) activity in different vital organs of adult rats



Data expressed as means \pm SEM. (A) Heart; (B) Liver; (C) Pancreas, (D) Kidney *Indicates significant difference of CT group ($P < 0.05$). CT: control group (n=8). AP: apical periodontitis group (n=9).

Table 1 – Influence of apical periodontitis (AP) on reactive species (RS) levels, catalase (CAT) activity and vitamin C (VIT C) levels in different tissues of adult rats.

	RS levels		CAT activity		VIT C levels	
	(% of control)		($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{g tissue}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)		(mg ascorbic acid $\cdot \text{g tissue}^{-1}$)	
	CT group	AP group	CT group	AP group	CT group	AP group
Heart	100.00 \pm 4.37	121.60 \pm 2.88*	343.80 \pm 11.90	323.60 \pm 13.70	47.90 \pm 2.75	36.22 \pm 3.73*
Liver	100.00 \pm 7.14	95.50 \pm 6.70	464.30 \pm 10.46	697.29 \pm 15.23*	86.07 \pm 3.32	86.84 \pm 3.35
Pancreas	100.00 \pm 1.44	94.42 \pm 5.34	286.69 \pm 13.15	233.06 \pm 18.26*	59.72 \pm 18.82	77.91 \pm 22.97
Kidney	100.00 \pm 9.87	84.44 \pm 7.34	473.35 \pm 9.63	518.63 \pm 11.32*	11.38 \pm 0.95	29.94 \pm 1.72*

Data expressed as means \pm SEM. *Indicates significant difference from CT group ($P < 0.05$). CT: control group (n=8). AP: apical periodontitis group (n=9).

3.3.2 Manuscrito 2 – Apical periodontitis increases oxidative damages and impairs ATPases activity in different organs of the young adult rats

Na continuidade dos estudos, realizamos, novamente, um experimento com o modelo animal de periodontite apical agora utilizando ratos Wistar machos e jovens a fim de verificar a influência da idade sobre os parâmetros analisados no experimento anterior. Além disso, esse estudo também teve como objeto a investigação da influência dos diferentes tempos de exposição pulpar (7, 14 e 21 dias) sobre parâmetros de estresse oxidativo e sobre as atividades da NKA e da CAA.

Title page**Apical periodontitis increases oxidative damages and impairs ATPases activity in different organs of the young adult rats.**

Raquel Cristine Silva Barcelos^a, Camilla dos Santos Tibúrcio-Machado^a, Higor Zuquetto Rosa^b, Karine Roversi^b, Marilise Escobar Burger^b, Carlos Alexandre de Souza Bier^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Rua Marechal Floriano Peixoto, 1184, Centro, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Cidade Universitária, Camobi, Santa Maria, RS, Brazil.

Corresponding author

Raquel Cristine Silva Barcelos (Ph.D)

Departamento de Estomatologia, UFSM

Av. Roraima, 1000.

97105-900 Santa Maria – RS – Brazil

raquel.barcelos@hotmail.com

Abstract

In apical periodontitis (AP), the generation of reactive species (RS) represent an important host defense mechanism, whose chronic imbalance of the redox system causes tissue damages. The consequent oxidative stress has been implicated in the AP pathogenesis and can modify the membrane enzymes activity such as ATPases. Based on this, the influence of AP on the oxidative stress parameters and on the Na⁺K⁺-ATPase (NKA) and Ca²⁺-ATPase (CAA) activities in the heart, liver and pancreas of the rats was evaluated. Young adult male Wistar rats were randomly designated in two experimental groups: control (CT group; n=21) and AP (AP group; n=24). In this last group, AP was induced by occlusal pulp exposure of the first right mandibular molar tooth. After 7, 14 and 21 days of AP induction, one third of each experimental group was euthanized and heart, liver and pancreas were collected for oxidative damages quantification, as also NKA and CAA activities. The occlusal pulp exposure was able to induce AP, and consequently, oxidative damages were observed in the heart, liver and pancreas, especially 21 days after occlusal pulp exposure. In general, AP was related to decrease in the NKA and CAA activities in all organs evaluated, with exception of the pancreatic CAA, whose activity was increased in all the times evaluated. The current findings suggest that the endodontic disease is able to exert deleterious influences on the oxidative system, thus affecting both NKA and CAA activities. Our outcomes reinforce the biological plausibility of an association between AP development and oxidative damages, besides adding changes in the cellular electrochemical gradient in the AP physiopathology.

Keywords: periapical lesion, sodium pump, calcium pump; endodontic lesion, oral-systemic relationship

Introduction

In the apical periodontitis (AP), reactive species (RS) generated by phagocytic cells in response to the bacterial challenge, represent an important defense mechanism of the host, whose imbalance of the redox system results in tissue damages. At molecular level, AP is a bacterial origin pathology that can lead to bone resorption, where the RS characterize as one of the most deleterious mechanisms (Zaragoza et al., 2006), especially when their generation exceeds the tissues antioxidant capacity, thus leading to the oxidative stress development. (Ebadi; Srinivasan; Baxi, 1996). Therefore, an increase in RS generation or a reduction in endogenous antioxidant defenses, or both, culminates in oxidative stress (Rochette et al., 2014). Oxidative stress contributes to several systemic diseases and has been involved in the pathogenesis of AP (Akalin et al., 2007; 2008; Dezerega et al., 2012; Inchingolo et al., 2014; Minczykowski et al., 2001).

Oxidative stress can also modulate the activity of membrane enzymes such as ATPases (Lima et al., 2009). Both Na^+K^+ -ATPase (NKA; sodium bomb) and Ca^{2+} ATPase (CAA; calcium bomb), two type P-type ATPases, are transmembrane enzymes that control ion flow through the active transport of potassium (K^+) and sodium (Na^+), and calcium (Ca^{2+}), respectively, in eukaryotes (Kühlbrandt, 2004). These ions play a fundamental role in the control of homeostasis and cellular electrochemical gradient. Whereas NKA is associated with vital physiological functions such as maintenance of cellular integrity, cell volume regulation and osmotic pressure (Shen; Sangiah, 1995), CAA maintains calcium homeostasis and is responsible for intracellular signaling events (Jones et al., 2010). Recently, a signaling function was discovered, as well as their involvement in neurodegenerative and systemic diseases, which are also related to oxidative damages (Yan; Shapiro, 2016).

Different studies have shown the occurrence of an oxidative regulation on the ATPase activities (Choudhary; Bodakhe, 2016; Ilhara; Kageyama; Kondo, 2005; Lima et al., 2009), however, such association has never been reported in AP, although both events, AP and ATPase activities, are influenced by oxidative stress (Choudhary; Bodakhe, 2016; Dezerega et al., 2012; Inchingolo et al., 2014; Minczykowski et al., 2001). The present study aimed to evaluate the influence of AP on the oxidative stress parameters, and on the NKA and CAA activities in the heart, liver and pancreas of the young adult rats.

Materials and methods

Animals

Young adult male Wistar rats (2 months old) were used. They were housed at four (± 1) animals per Plexiglas® cages with free access to food (standard chow; Supralab®, Alisul Alimentos LTDA, São Leopoldo, RS, Brazil) and tap water in a room with controlled temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), on a 12h light/dark cycle. Before starting the experimental protocol, animals underwent an acclimatization period of 7 days. The Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA nº 7021190117), which is affiliated to the Council of Animal Experiments (CONCEA), following international norms of animal care and maintenance, approved all procedures with animals.

Protocol of AP induction

Rats were randomly designed to two experimental groups: (I) control (CT group; no AP; n=21); (II) apical periodontitis (AP group; n=24). In order to induce experimental AP, each animal of AP group had the occlusal surface of the right first mandibular molar open until pulp exposure under anesthesia (ketamine/xylazine, 70 and 6 mg/kg, intramuscular injection, respectively), with spherical high velocity tips 1011 HL (KG Sorensen® Ind. Com. Ltda, Barueri, SP, Brazil), under constant irrigation. . Intact right mandibular first molars were used as controls (CT group) (Wolle et al., 2013). After 7, 14 and 21 days of pulp exposure, one third of each experimental group were anesthetized (ketamine/xylazine, 70 and 6 mg/kg, intramuscular injection, respectively), euthanized by cardiac puncture, and heart, liver and pancreas were collected from each rat (Fig. 1). The tissues were homogenized in TrisHCl buffer (10mM; pH 7.4), centrifuged at 3640g for 15min and the supernatants were used for biochemical analysis according to the method described below. The jaws were removed and submitted to radiographic shots for analyzed for presence of periapical lesion in the CT group.

Biochemical assessments - Oxidative status

RS generation determination. The RS generation were measured using the oxidant sensing fluorescent probe, 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA, Sigma Aldrich®, São Paulo, SP, Brazil) (Hempel et al., 1999). The oxidation of the DCHF-DA to dichlorofluorescein (DCF) was determined at 488nm for excitation and 525nm for emission. Tissues samples were incubated for 1h until fluorescence measurement. DCF-RS generation were corrected by protein content (Lowry et al., 1951), and expressed as percentage of CT group.

Lipoperoxidation (LP) levels estimation. LP levels were estimated using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), as described by Ohkawa et al. (1979). This measure is based

on a reaction with malondialdehyde (MDA) resulting from oxidative damage in lipid membranes with thiobarbituric acid, in which pink chromogen is generated and can be spectrophotometrically measured at 532nm. The TBARS levels were expressed as nmol MDA/g tissue.

Protein carbonyl (PC) levels determination. PC levels were quantified mixing tissue samples with 2,4-dinitrophenylhydrazine (10mM DNPH, Sigma Aldrich®, São Paulo-Brazil) for 1h (Yan et al., 1995). Sequentially, denaturing buffer (150mM sodium phosphate buffer, pH6.8, 3% SDS), heptane (99.5%) and ethanol (99.8%) (all reagents from Vetec® Química Final, Rio de Janeiro-Brazil) was added. Protein isolated was washed twice with ethyl acetate/ethanol (Vetec® Química Final, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) 1:1 (v/v) and suspended in buffer. Each sample was measured at 370nm against the corresponding HCl sample (blank). Total carbonylation was calculated according to Levine et al. (1990). The PC levels were expressed as nmol carbonyl/g tissue.

NKA and CAA activities assays. The assays of both NKA and CAA activities were adapted from Muszbek et al. (1977), and Meissner, Conner and Fleischer (1973), respectively. The methods are based on inorganic phosphate (Pi) released by ATP (Sigma Aldrich®, São Paulo, SP, Brazil) hydrolysis (Atkinson et al., 1973). The formed molibdate-Pi complexes were measured spectrophotometrically at 405nm. Values were calculated in relation to standard curve constructed with Pi at known concentrations and corrected by protein (Lowry et al., 1951). The NKA and CAA activities were expressed as nmol Pi/mg protein/min.

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm standard error (SE). All data were analyzed using two-way ANOVA followed by Duncan's test for comparisons, when appropriate. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant for all comparisons made.

Results

Biochemical measurements

Influence of AP on the oxidative status: RS generation, LP and PC levels, besides in different peripheral vital organs of rats (Table 1).

In the heart, AP group showed increases RS generation 7 days after the pulp exposure, whose percentage were significantly minor in the subsequent days. At the different times

evaluated, AP group showed no changes in the cardiac LP generation. Oxidative damages on the cardiac proteins were quantified by their carbonylation, whose levels were progressively increased in the AP group on days 14 and 21 post pulp exposure, compared to day 7 post injury and each other, as well as in relation to the CT group at the same time.

In the liver, AP group showed no changes in the RS levels in comparison to CT group. However, the LP levels were increased in the day 14 post pulp exposure in relation to CT group in the same day. At 14th day, hepatic LP levels was significantly higher than those observed in both 7th and 21th days post pulp exposure, which were also different each other. Considering the hepatic PC levels, only after 21 days post pulp exposure this oxidative marker was increased in relation to CT group in the same day, whose levels were significantly higher than those observed in the other evaluated days.

In the pancreas, all oxidative parameters quantified, that is, RS, LP and PC levels were increased at 21th day post pulp exposure in relation to CT group in the same time. Comparisons among the three times evaluated showed that both RS and LP levels were higher in the day 21 post pulp exposure in relation to both days 7 and 14, which were similar each other. Furthermore, at the 21th day, the increased pancreatic PC levels was higher than those observed in the day 7th post pulp exposure.

Influence of AP on both NKA and CAA activities in different vital organs of rats (Figure 2).

In the heart, AP group showed decreased NKA activity on the 21th day post pulp exposure, whereas CAA was increased on the 7th and decreased on the 21th day post pulp exposure in relation to CT group (Fig. 2A and B, respectively). Comparisons among time showed minor NKA activity on the 21th day, in relation to both previous evaluated times (Fig. 2A), while inversely, the CAA activity at the first day evaluated was higher than the subsequent days, which were similar each other (Fig. 2B).

In the liver, considering the CT group, AP group showed decreased NAK activity in all times observed, whereas the CAA activity was decreased in both 14th and 21th days post pulp exposure. Comparisons inside the AP group showed significant differences among all time observed, indicating a progressive minor activity of the CAA time-depending (Fig. 2C and D, respectively).

In the pancreas, comparisons between CT and AP groups showed that the AP decreased the NAK activity at 7th and 21th days after pulp exposure, whereas the CAA was increased in all times observed (Fig. 2E and F, respectively). Comparisons inside groups showed no

differences of time on the NAK activity (Fig. 2E), however the CAA activity was higher at 21th day post pulp exposure in relation to both 7th and 14th days, whose activities were similar each other (Fig. 2F).

Discussion

Poor oral health and adverse systemic outcomes has been suggested (Gomes et al., 2012). The current study was developed to evaluate oxidative parameters and ATPases activities AP-induced in different vital organs of the young rats. Our findings showed that: (i) the occlusal exposure of the pulp of the right mandibular first molar led to pulp necrosis, thus inducing AP development, which was observed by the radiographically visible apical radiolucent area; (ii) AP was able to induce oxidative damages in heart, liver and pancreas, mostly on the 21th day post pulp exposure; (iii) oxidative damages related to AP development, impaired both sodium and calcium bomb activities in the same organs evaluated; and (iv) by AP influence, in the short term, the calcium pump showed increased activity in both heart and pancreas, whereas the persistence of the endodontic lesion reduced its activity in both heart and liver on the 14th and 21th days post pulp exposure.

In this study, AP was related to increasing in the RS cardiac levels on the 7th day post pulp exposure, what possibly was generate from the inflammatory processes mediated by endodontic pathogens, together with the recruitment of leukocytes that are evoked by chemotaxis, thus developing oxidative damages, whose intensity is directly dependent on the infection gravity (Steeves et al., 2011). The RS generation impairs excitation-contraction coupling (Maack et al, 2009), induces arrhythmia (Akar et al., 2005), so contributing for cardiac remodeling by activates signaling pathways, which cause tissue hypertrophy, apoptosis, and necrosis (Erickson et al., 2008; Ago et al., 2008; Giorgio et al., 2005; Halestrap, 2005). The oxidative damage that result from higher RS levels can affect physiological structural element, including proteins, amino acids, lipids, and carbohydrates (Anderson, 1996). In the short term, we observed an increased cardiac CAA activity on the 7th day post pulp exposure. The activation of ATPases has been demonstrated as a protection mechanism of their enzymatic activity against denaturing process (Xu et al., 2005), that can be raised in pathological processes (Choudhary; Bodakhe, 2016; Sartori et al., 2017), as observed in this study. From 14th day post pulp exposure, with the persistence of endodontic infection, calcium bomb activity decreased until the last experimental evaluation at 21th day, whose activity was minor than the CT group. In this last evaluation, our findings also showed that an increased PC levels in the heart, which may be related to the ATPases inactivation and the consequent reduction of their activities, as

observed in both sodium and calcium pumps. A variety of pathological conditions in the heart had shown decreasing in the activity and expression of calcium pump (Periasamy; Huke, 2001), whose etiology was related to oxidative stress (Bishopric; Anderka; Slepak, 2001). The calcium pump is sensitive to oxidative stress and its impaired activity may be implicated in myocardial cells dysfunction (Ilhara; Kageyama; Kondo, 2005). Therefore, a decreased activity or expression of the calcium pump can be considered a marker of heart failure (Eisner; Caldwell; Trafford, 2013), demonstrating the damage that AP can exert on cardiac function, which is being confirmed through our findings. Furthermore, the deleterious influence of AP development was also observed on the cardiac NKA, which showed reduced activity in a time dependent manner, which was observed from dental pulp exposure until the 21th day post pulp exposure, when its activity was minor than those observed in the CT group. The activity of the NKA is also crucial for the control of different cardiac conditions (Sehirli et al., 2015; Drummond et al., 2016) due its regulatory action on cytokines secretion (Qin et al., 2016). In the heart, NKA activity maintains a balanced sodium gradient, which is essential for generating rapid upstroke of the action potential to maintain the ionic homeostasis, thus driving a number of ions exchange and transport processes critical for normal cellular function, and control of the cell volume (Fuller et al., 2013). In summary, the NKA indirectly controls myocardial contractility (Blaustein, 1977). As observed in our findings, AP can be potentially harmful to both NKA and CAA activities, which can be particularly worrying in patients with cardiovascular diseases, in which oxidative stress plays a crucial role and is causally linked to the progression of the disease (Giordano, 2005; Balaban; Nemoto; Finkel, 2005; Kohlhaas et al., 2010; Nakamura et al., 2002). According, patients affected by chronic AP presented reduction in the antioxidant status and higher levels of systemic oxidative stress (Inchingolo et al., 2014). Moreover, elevated levels of oxidative stress markers were detected in the saliva and in the endodontium of the patients with AP (Vengerfeldt et al., 2017). A positive association between chronic AP and oxidative stress also had been demonstrated (Inchingolo et al., 2014; Vengerfeldt et al., 2017), thus confirming our findings.

Advancing our interpretations, in the liver a decreasing in the NKA activity from 7th day post pulp exposure was observed. Owing to the short half-life and high reactivity of RS (Anderson, 1996), our study showed consequences of increasing of their generation, thus decreasing the NKA activity, what can be related to the RS-induced protein carbonilation due to the endodontic infection. On the continuity of our observations, on the 14th day, post pulp exposure induced increasing on hepatic LP levels in relation to CT group. Indeed, LP development is closely involved in RS-induced tissue damages (Del Rio; Stewart; Pellegrini,

2005), since these RS are able to react with polyunsaturated fatty acids of cellular membranes or lipoproteins (Akalin et al., 2007), thus affecting their function and structural integrity (Van Ginkel; Sevanoan, 1994). An oxidative imbalance favoring RS generation in patients with AP versus healthy controls and endodontically-treated patients has already been demonstrated (Dezerega et al., 2012), proving evidences that RS generation is implicated in the damages of the extracellular matrix components incurred during inflammatory diseases (Lamster; Novak, 1992). On the 14th day post pulp exposure, such AP-induced oxidative stress scenario also affected both NKA and CAA, reducing their activities in the liver. Considering the RS and LP quantification, their increased levels are accepted as biomarker of oxidative stress (Khalili; Bilokytska, 2008), since they play a role in the AP pathogenesis (Dezerega et al., 2012; Inchingolo et al., 2014; Minczykowski et al., 2001). Based on this, we hypothesize that the increasing of these biomarkers might contribute to decreasing in the ATPases activities, as observed in the AP group. This concept is in agreement with previous reports, which showed an oxidative regulation of ATPases (Choudhary; Bodakhe, 2016; Ilhara; Kageyama; Kondo, 2005; Lima et al., 2009). In addition, infectious pathologies also interfere with ATPases activity. Studies involving Herpes simplex virus infection (Mi et al., 2010; Schaefer et al., 1982) and the *Aeromonas hydrophila* bacterium (Kong et al., 2017) have shown reduced NKA activity, although the exact mechanism is not yet clear. On the day 21, AP was related to the high levels of both LP and PC, in addition to decreased sodium and calcium pumps activities. According, neutrophils obtained from peripheral blood of AP-patients showed increased parameters of oxidative stress (Minczykowski, 2001). Like sodium pump, the calcium pump is an integral membrane protein and therefore susceptible to oxidative stress (Choudhary; Bodakhe, 2016; Ilhara; Kageyama; Kondo, 2005; Lima et al., 2009), as demonstrated by recent studies (Baskaran et al., 2018; Miltonprabu; Sumedha, 2014).

In the pancreas, our findings showed reduced NKA activity of the AP group on the 7th day post pulp exposure, which can be consequent to the RS generation-induced proteins oxidative damages, due to the endodontic infection. Since production rates of RS are similar to reaction rates with biomolecules (Floyd, 1990), we didn't detecting differences in RS levels between the experimental groups due to their high reaction speeds, but we can observed the consequences of the RS generated by AP at this experimental time. As observed in a variety of disturbances related to RS overproduction and to consequent oxidative stress development, AP has been described by induce damages to cellular macromolecules (Anderson, 1996). In this context, on the 21th day post pulp exposure, our outcomes showed a decreasing in NKA activity in the AP group, as well as increasing all oxidative parameters here evaluated, such as RS, LP

and PC levels, reinforcing the involvement of oxidative stress in the AP pathogenesis, as previously suggested (Dezerega et al., 2012; Inchingolo et al., 2014; Minczykowski et al., 2001). A reduced activity and expression of the pancreatic NKA pump is related to hyperinsulinaemia and insulin resistance as it occurs in type 2 diabetes mellitus and obesity (Iannello; Milazzo; Belfiore, 2007). In the process of glucose-induced insulin release from the pancreatic β -cell, calcium plays an important role (Herchuelz; Pachera, 2017). Interestingly, from our current findings, we observed an increasing in calcium pump in AP group in all evaluated time-points, which can be related to decreased calcium levels in the cytosol and apoptosis induction, as demonstrated by Herchuelz and Pachera (2017).

In summary, through the current study, we are showing that AP development can exert deleterious influences on the oxidative status and consequently to affects the ATPases activities in vital organs such as heart, liver and pancreas. We hypothesized that the systemic damage AP-induced is time dependent, ie worsening with persistent endodontic lesion, negatively modifying markers of oxidative stress and impairing ATPases activity in the mentioned tissues. Indeed, oxidative damages in the cell membranes could impair membrane bound enzymes, such as NKA and CAA (Timbrell, 1999), which are important transporter enzymes for ion exchange. Thus, to protect itself from oxidative stress AP induced, each organ responds differently (Vani et al., 2013), whose protection is dependent of the antioxidant defense system, which includes different enzymes and endogenous factors here not accessed. Here, the oxidative damages to plasma membranes AP induced, impaired the activity of membrane bound enzymes, as ATPases. From our outcomes, we can propose that AP development may impair the general health and reinforce the biological plausibility of an association between AP and oxidative systemic outcomes. Moreover, we can suggest that changes in the cellular electrochemical gradient can be involved in physiopathology of the AP.

References

- Ago T, Liu T, Zhai P, Chen W, Li H, Molkentin JD, Vatner SF, Sadoshima J (2008) A redox-dependent pathway for regulating class II HDACs and cardiac hypertrophy. *Cell* **133**, 978-993.
- Akalin FA, Baltacioglu E, Alver A, Karabulut E (2007) Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 558-565.
- Akalin FA, İşiksal E, Baltacioglu E, Renda N, Karabulut E (2008). Superoxide dismutase activity in gingiva in type-2 diabetes mellitus patients with chronic periodontitis. *Archives of Oral Biology* **53**, 44-52.
- Akar FG, Aon MA, Tomaselli GF, O'Rourke B (2005) The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 3527-3535.
- Anderson D (1996) Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research* **350**, 103-108.
- Atkinson A, Gatenby AD, Lowe AG (1973) The determination of inorganic orthophosphate in biological systems. *Biochimica Biophysica Acta* **320**, 195-204.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483-495.
- Baskaran R, Priya LB, Sathish Kumar V, Padma VV (2018) *Tinospora cordifolia* extract prevents cadmium-induced oxidative stress and hepatotoxicity in experimental rats. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine* **9**, 252-257.
- Bishopric NH, Anderka P, Slepak Y, Webster KA (2001) Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. *Current Opinion Pharmacology* **1**, 141-150.
- Blaustein MP (1977) Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: a reassessment and a hypothesis. *American Journal of Physiology* **232**, C165-C173.
- Choudhary R, Bodakhe SH (2016) Magnesium taurate prevents cataractogenesis via restoration of lenticular oxidative damage and ATPase function in cadmium chloride-induced hypertensive experimental animals. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **84**, 836-844.
- Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* **15**, 316-328.
- Dezerega A, Madrid S, Mundi V, Valenzuela MA, Garrido M, Paredes R, García-Sesnich J, Ortega AV, Gamonal J, Hernández M (2012) Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response. *Journal of Inflammation* **9**, 1-9.
- Drummond CA, Hill MC, Shi H, Fan X, Xie JX, Haller ST, Kennedy DJ, Liu J, Garrett MR, Xie Z, Cooper CJ, Shapiro JI (2016) Na/K-ATPase signaling regulates collagen synthesis through microRNA-29b-3p in cardiac fibroblasts. *Physiological Genomics* **48**, 220-229.

Ebadi M, Srinivasan SK, Baxi MD (1996) Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology* **48**, 1-19.

Eisner D, Caldwell J, Trafford A (2013) Sarcoplasmic Reticulum Ca-ATPase and Heart Failure 20 Years Later. *Circulation Research* **113**, 958-961.

Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJ, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME (2008) A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* **133**, 462-474.

Floyd RA (1990) Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J* **4**, 2587-97.

Fuller W, Tulloch LB, Shattock MJ, Calaghan SC, Howie J, Wypijewski KJ (2013) Regulation of the cardiac sodium pump. *Cellular and Molecular Life Science* **70**, 1357-1380.

Galley H, Davies MJ, Webster NR (1996) Ascorbil radical formation in patients with sepsis: effects of ascorbate loading. *Free Radical Biology & Medicine* **20**, 139-143.

Giordano FJ (2005) Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 500-508.

Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, Pelliccia G, Luzi L, Minucci S, Marcaccio M, Pinton P, Rizzuto R, Bernardi P, Paolucci F, Pelicci PG (2005) Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* **122**, 221-233.

Gomes MS, Chagas P, Padilha DMP, Caramori P, Hugo FN, Schwanke CHA, Hilgert JB (2012) Association between self-reported oral health, tooth loss and atherosclerotic burden. *Brazilian Oral Research* **26**, 436-42.

Halestrap A (2005) Biochemistry: a pore way to die. *Nature* **434**, 578-579.

Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM (1999) Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-carboxy-2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine. *Free Radical Biology & Medicine* **27**, 146-159.

Herchuelz A, Pachera N (2017) The Na⁺/Ca²⁺ exchanger and the Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase in β -cell function and diabetes. *Neuroscience Letters* **663**, 72-78.

Iannello S, Milazzo P, Belfiore F (2007) Animal and human tissue Na,K-ATPase in normal and insulin-resistant states: regulation, behaviour and interpretative hypothesis on NEFA effects. *Obesity Reviews* **8**, 231-251.

Iihara Y, Kageyama K, Kondo T (2005) Overexpression of calreticulin sensitizes SERCA2a to oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **329**, 1343-13495.

Inchingolo F, Marrelli M, Annibaldi S, Cristalli MP, Dipalma G, Inchingolo AD, Palladino A, Inchingolo AM, Gargari M, Rattullo M (2014) Influence of endodontic treatment on systemic oxidative stress. *International Journal of Medical Sciences* **11**, 1-6.

Jones S, Solomin A, Moore C, Holbrook L, Cartwright EJ, Neyses L, Emerson M (2010) The plasma membrane calcium ATPase modulates calcium homeostasis, intracellular signaling events and function in platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 8, 2766-2774.

Khalili J, Bilokytska HF (2008) Salivary MDA levels in clinically healthy and periodontal disease individuals. *Journal of Oral Diseases* **14**, 754-760.

Kohlhaas M, Liu T, Knopp A, Zeller T, Ong MF, Böhm M, O'Rourke B, Maack C (2010) Elevated Cytosolic Na⁺ Increases Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species in Failing Cardiac Myocytes. *Circulation* **13**, 1606-1613.

Kong WG, Li SS, Chen XX, Huang YQ, Tang Y, Wu ZX (2017) A study of the damage of the intestinal mucosa barrier structure and function of *Ctenopharyngodon idella* with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Physiology and Biochemistry* **43**, 1223-1235.

Kühlbrandt W (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **5**, 282-95.

Lamster IB, Novak MJ (1992) Host mediators in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* **3**, 31-60.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* **186**, 464-478.

Lima FD, Oliveira MS, Furian AF, Souza MA, Rambo LM, Ribeiro LR, Silva LF, Retamoso LT, Hoffmann MS, Magni DV, Pereira L, Figuera MR, Mello CF, Royes LF (2009) Adaptation to oxidative challenge induced by chronic physical exercise prevents Na,K-ATPase activity inhibition after traumatic brain injury. *Brain Research* **1279**, 147-55.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin Phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.

Maack C, Dabew ER, Hohl M, Schäfers HJ, Böhm M (2009) Endogenous activation of mitochondrial KATP channels protects human failing myocardium from hydroxyl radical-induced stunning. *Circulation Research* **105**, 811-817.

Meissner G, Conner GE, Fleischer S (1973). Isolation of sarcoplasmic reticulum by zonal centrifugation and purification of Ca²⁺-pump and Ca²⁺ binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **298**, 246-269.

Mi SF, Li Y, Yan JH, Gao GF (2010) Na⁺/K⁺-ATPase β 1 subunit interacts with M₂ proteins of influenza A and B viruses and affects the virus replication. *Science China Life Sciences* **53**, 1098-1105.

Miltonprabu S, Sumedha NC (2014) Arsenic-induced hepatic mitochondrial toxicity in rats and its amelioration by diallyl trisulfide. *Toxicology Mechanisms and Methods* **24**, 124-135.

Minczykowski A, Woszczyk M, Szczepanik A, Lewandowski L, Wysocki H (2001) Hydrogen peroxide and superoxide anion production by polymorphonuclear neutrophils in patients with chronic periapical granuloma, before and after surgical treatment. *Clinical Oral Investigations* **5**, 6-10.

Muszbek L, Szabó T, Fésus L (1977) A highly sensitive method for the measurement of ATPase activity. *Analytical Biochemistry* **77**, 286-288.

Nakamura R, Egashira K, Machida Y, Hayashidani S, Takeya M, Utsumi H, Tsutsui H, Takeshita A (2002) Probucol attenuates left ventricular dysfunction and remodeling in tachycardia-induced heart failure: roles of oxidative stress and inflammation. *Circulation* **106**, 362-367.

Ohkawa H, Ohishi H, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* **95**, 351-358.

Oktay S, Chukkapalli SS, Rivera-Kweh MF, Velsko IM, Holliday LS, Kesavalu L (2015) Periodontitis in rats induces systemic oxidative stress that is controlled by bone-targeted antiresorptives. *Journal of Periodontology* **86**, 137-145.

Periasamy M, Huke S (2001) SERCA pump level is a critical determinant of Ca(2+) homeostasis and cardiac contractility. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **33**, 1053-63.

Qin H, Zhang Y, Wang R, Du X, Li L, Du H (2016) Suppresses Na⁺-K⁺-ATPase-mediated systemic inflammation and CD36 expression, and alleviates cardiac lipotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **68**, 465-472.

Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C (2014) Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta* **1840**, 2709-2729.

Sartori S, Jardim NS, Sari MH, Flores EF, Prigol M, Nogueira CW (2017) Diphenyl diselenide reduces oxidative stress and toxicity caused by HSV-2 infection in mice. *Journal of Cellular Biochemistry* **118**, 1028-1037.

Schaefer A, Kühne J, Zibirre R, Koch G (1982) Poliovirus-induced alterations in HeLa cell membrane functions. *Journal of Virology* **44**, 445-449.

Shirli AÖ, Tetik S, Yiginer Ö, Cetinel S, Özkan N, Akkiprik M, Kaya Z, Yegen BC, Tezcan M, Aykac A, Sener G (2015) OP-022 alterations in cardiac Caveolin-3 expression and Na/K ATPase activity in rats with myocardial infarction are reversed by resveratrol. *American Journal of Cardiology* **115**, S8.

Shen Y, Sangiah S (1995) Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase, glutathione, and hydroxyl free radicals in cadmium chloride-induced testicular toxicity in mice. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **29**, 174-9.

Singal AK, Jampana SC, Weinman SA (2011) Antioxidants as therapeutic agents for liver disease. *Liver International* **31**, 1432-48.

Steeves CH, Potrykus J, Barnett DA, Bearne SL (2011) Oxidative stress response in the opportunistic oral pathogen *Fusobacterium nucleatum*. *Proteomics* **11**, 2027-37.

Timbrell J (1999) *Principles of biochemical toxicology*, 4th ed London, UK: CRC Press.

Van Ginkel G, Sevanian A (1994) Lipid peroxidation-induced membrane structural alterations. *Methods Enzymology* **233**, 273-288.

Vani MG, Kumar KJ, Liao JW, Chien SC, Mau J L, Chiang SS, Lin CC, Kuo YH, Wang SY (2013) Antcin C from *Antrodia cinnamomea* Protects Liver Cells Against Free Radical-Induced Oxidative Stress and Apoptosis In Vitro and In Vivo through Nrf2-Dependent Mechanism. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine* **2013**, 296082, 2013.

Vengerfeldt V, Mändar R, Saag M, Piir A, Kullisaar T (2017) Oxidative stress in patients with endodontic pathologies. *Journal of Pain Research* **10**, 2031-2040.

Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L (2002) Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* **32**, 279-305.

Wolle CFB, Zollmann LA, Bairros PO, Etges A, Leite CE, Morrone FB, Campos MM (2013) Outcome of periapical lesions in a rat model of type 2 diabetes: refractoriness to systemic antioxidant therapy. *Journal of Endodontics* **39**, 643-7.

Xu KY (2005) Activation of (Na⁺K⁺)-ATPase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 1669-1677.

Yan LY, Traber MG, Packer L (1995) Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Analytical Biochemistry* **228**, 349-51.

Yan Y, Shapiro JI (2016) The physiological and clinical importance of sodium potassium ATPase in cardiovascular diseases. *Current Opinion in Pharmacology* **27**, 43-49.

Zaragoza C, López-Rivera E, García-Rama C, Saura M, Martínez-Ruiz A, Lizarbe TR, Martín-de-Lara F, Lamas S (2006) Cbfa-1 mediates nitric oxide regulation of MMP-13 in osteoblasts. *Journal of Cell Science* **119**, 1896-1902.

Captions

Figure 1 – Experimental design

Figure 2 – Apical periodontitis (AP) influence on Na⁺K⁺-ATPase (NKA) and Ca²⁺-ATPase (CAA) activities in different vital organs of young rats. Data expressed as means±SE. CT: control group. AP: apical periodontitis group. (A,B) Heart; (C,D) Liver; (E,F) Pancreas. Different lower case letters (a-c) indicate significant difference between groups in the same experimental group ($P<0.05$)

Table 1 – Influence of apical periodontitis (AP) in different times on oxidative status in heart, liver and pancreas of young rats. Data are mean±SE. CT: control group. AP: apical periodontitis group. *Indicates significant difference of the CT group in the same evaluated time ($P<0.05$). Different lower case letters (a-c) indicate significant difference between groups in the same experimental group ($P<0.05$). Abbreviations and units: RS - Reactive species, expressed as % of CT group; LP- lipoperoxidation, expressed as nmol malondialdehyde (MDA).g tissue⁻¹; PC - protein carbonyls, expressed as nmol carbonyl.g tissue⁻¹

Figure 1 – Experimental design

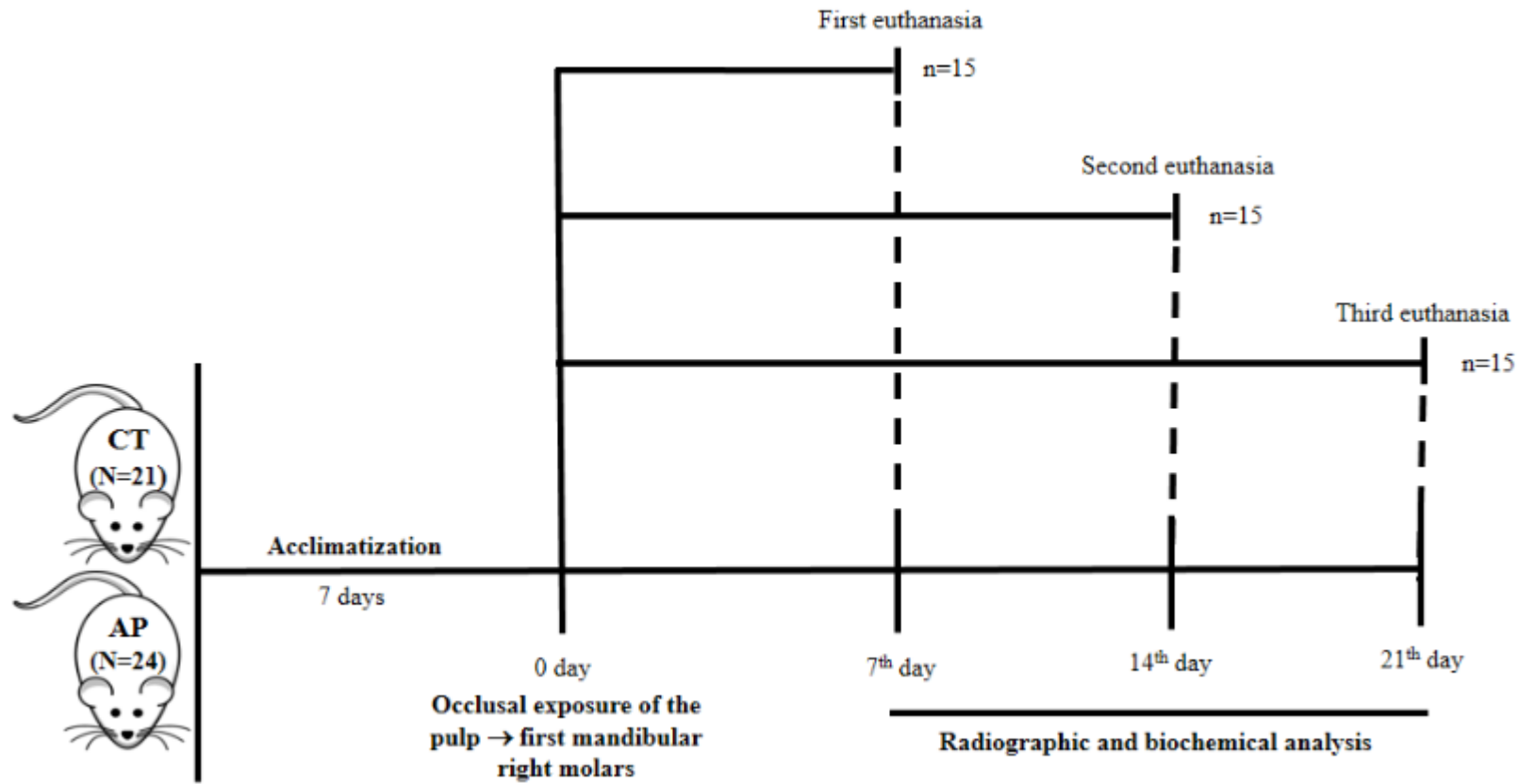
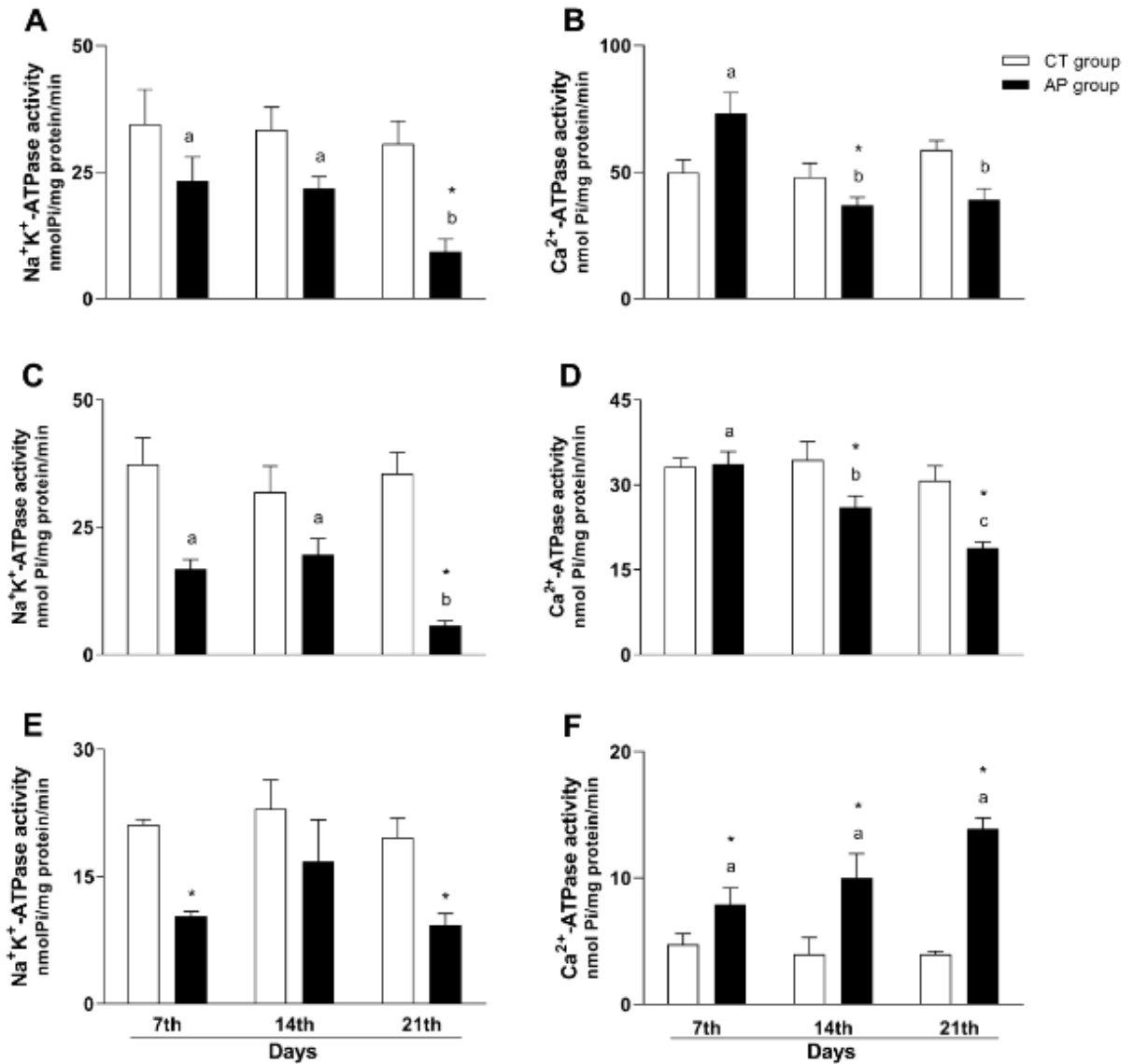


Figure 2 – Apical periodontitis (AP) influence on Na^+K^+ -ATPase (NKA) and Ca^{2+} -ATPase (CAA) activities in different vital organs of young rats.



Data expressed as means \pm SE. CT: control group. AP: apical periodontitis group. (A,B) Heart; (C,D) Liver; (E,F) Pancreas. Different lower case letters (a-c) indicate significant difference between groups in the same experimental group ($P<0.05$).

Table 1 – Influence of apical periodontitis (AP) in different times on oxidative status in heart, liver and pancreas of young rats.

	Heart		Liver		Pancreas	
	CT group	AP group	CT group	AP group	CT group	AP group
RS generation						
7 th day	39.8±2.6	68.2±3.3 ^{a*}	103.4±3.0	117.9±18.7	9.9±1.5	9.3±0.9 ^b
14 th day	34.4±3.6	45.6±8.3 ^b	93.1±13.3	135.0±8.4	12.1±2.5	11.2±1.6 ^b
21 th day	37.2±12.2	27.3±6.3 ^b	124.2±15.5	111.4±18.5	11.0±1.5	20.5±1.4 ^{a*}
LP levels						
7 th day	109.2±7.4	102.7±6.1	286.2±20.0	301.0±32.3 ^b	44.91±4.8	40.4±3.1 ^b
14 th day	103.8±11.1	95.6±7.7	312.5±18.0	480.3±17.4 ^{a*}	43.2±1.2	43.7±3.7 ^b
21 th day	91.3±2.4	86.4±6.1	267.3±10.6	220.0±22.0 ^c	45.3±2.9	55.5±3.7 ^{a*}
PC levels						
7 th day	934.7±79.5	846.1±120.4 ^c	1111.4±97.8	1089.4±19.7 ^b	603.3±42.9	584.5±52.8 ^b
14 th day	910.1±50.2	1128.4±30.4 ^b	1206.4±39.9	1013.6±52.6 ^b	553.2±27.9	775.3±88.6 ^{ab}
21 th day	952.3±60.9	2446.8±151.0 ^{a*}	1027.3±51.0	2159.9±125.8 ^{a*}	492.7±47.9	888.9±170.9 ^{a*}

Data are mean±SE. CT: control group. AP: apical periodontitis group. *Indicates significant difference of the CT group in the same evaluated time ($P<0.05$). Different lower case letters (a-c) indicate significant difference between groups in the same experimental group ($P<0.05$). Abbreviations and units: RS- Reactive species, expressed as % of CT group; LP- lipoperoxidation, expressed as nmol malondialdehyde (MDA).g tissue⁻¹; PC- protein carbonyls, expressed as nmol carbonyl.g tissue⁻¹.

4 DISCUSSÃO

Recentemente, uma revisão sistemática e meta-análise do nosso grupo de pesquisa mostrou que 52% dos indivíduos apresentam pelo menos um dente com periodontite apical (TIBÚRCIO-MACHADO et al., 2019). Estudos epidemiológicos de prevalência e casos-controle demonstraram a associação entre a periodontite apical e diferentes condições sistêmicas, como diabetes, doenças cardíacas e fumo (COTTI; MERCURO, 2015; SEGURA-EGEA et al., 2005; 2008). Tais pesquisas formaram a base do desenvolvimento da medicina endodôntica que visa estudar as possíveis repercussões endodônticas na saúde sistêmica e vice-versa (SEGURA-EGEA et al., 2015). Não há dúvida da evidência científica da associação entre as doenças endodôntica e sistêmica, que levou a uma maior atenção ao diagnóstico e tratamento dessa doença dentária em pacientes com comprometimento sistêmico, resultando em melhora na qualidade da saúde bucal e sistêmica (SEGURA-EGEA, 2018). Nesse contexto, desde 2017, o nosso grupo de pesquisa promove um conjunto de ações que integra um programa de extensão do curso de Odontologia (UFSM). Tais ações têm como foco o tratamento de canal de dentes de moradores da cidade de Santa Maria (RS) e região. Esses indivíduos apresentam doenças sistêmicas, como diabetes, hipertensão, osteoporose, infecção pelo vírus HIV, doença renal crônica e doenças cardiovasculares. Tais enfermidades têm sua fisiopatologia direta ou indiretamente relacionada ao desenvolvimento de estresse oxidativo, evento que também pode ser influenciado pela saúde bucal (AKALIN et al., 2007; 2008; DEZEREGA et al., 2012; INCHINGOLO et al., 2014; MINCZYKOWSKI et al., 2001). Nesse âmbito nasceu o desejo de estudar a repercussão sistêmica da infecção endodôntica considerando parâmetros de estresse oxidativo em diferentes órgãos. No presente estudo, a influência da periodontite apical sobre órgãos vitais como coração, fígado, pâncreas e rim foi avaliada em ratos machos adultos e jovens. Assim, parâmetros de estresse oxidativo em ratos e sua relação com (i) a geração de ER; (ii) a oxidação de lipídios e proteínas; (iii) a atividade e/ou nível de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos tais como a CAT e a VIT C; e (iv) as atividades das enzimas NKA e CAA foram avaliados.

As avaliações foram precedidas da indução da periodontite apical através da exposição oclusal da polpa do primeiro molar mandibular direito (WOLLE et al., 2013) de ratos machos adultos e adultos jovens por 21 dias, e por 7, 14 e 21 dias, correspondendo aos manuscritos 1 e 2 apresentados aqui, respectivamente. Tal abordagem sobre a influência sistêmica da periodontite apical foi um grande desafio já que, até o momento, as pesquisas do nosso grupo estavam voltadas para estudos clínicos e *in vitro*. Além disso, dados da literatura mostravam

que a presença de periodontite apical em um único dente não induziu alterações sistêmicas significativas (CINTRA et al., 2014a; b; c). Assim, surgiam duas novas exigências: a padronização de um modelo animal de periodontite apical em ratos machos adultos e adultos jovens, e a padronização de técnicas de determinação de danos oxidativos, defesas antioxidantes e atividades de ATPases em diferentes tecidos desses animais.

Diferentes metodologias que avaliam os efeitos deletérios da periodontite apical têm sido descritas na literatura e incluem a indução de periodontite apical em um único dente (CINTRA et al., 2014a; b; c; WOLLE et al., 2012; 2013) ou múltiplas periodontites apicais (CINTRA et al., 2016), em dentes imaturos (SCARPARO et al., 2011), estudos longitudinais (GOMES et al., 2016), estudos *in vitro* com células troco de medula óssea (MARTINS et al., 2016), ratos diabéticos (AZZUMA et al., 2017; FERREIRA et al., 2017; PRIETO et al., 2017), estudos clínicos (GOMES et al., 2018), sob suplementação profilática e terapêutica de ômega 3 (AZUMA et al., 2018a; b) e administração sistêmica de probióticos (COSME-SILVA et al., 2019), entre outros. A partir dessas considerações, o primeiro experimento cujo estudo perfaz o manuscrito 1 foi desenvolvido em ratos Wistar, machos, adultos (16 meses de idade) e avaliou os danos oxidativos e a atividade da NKA no coração, fígado, pâncreas e rim. Na continuidade dos estudos, para verificar a influência da idade e de diferentes tempos de exposição pulpar sobre os mesmos parâmetros analisados no primeiro experimento com a inclusão da análise da atividade da CAA, um segundo protocolo experimental foi desenvolvido com ratos Wistar, machos, adultos jovens (2 meses de idade).

A partir do experimento descrito no manuscrito 1 foi possível observar que a presença da periodontite apical, que foi induzida no primeiro molar mandibular direito de cada rato Wistar, macho, adulto do grupo periodontite apical foi relacionada à repercussões sistêmicas em diferentes órgãos desses animais após 21 dias da exposição pulpar. Deste modo, observamos que cada órgão respondeu de uma maneira frente à presença da infecção endodôntica. Assim, observamos uma redução dos níveis de VIT C e da atividade da CAT no coração e no pâncreas, respectivamente. Além disso, o fígado apresentou aumento da atividade da CAT, enquanto que no rim observamos um aumento na atividade da CAT e nos níveis de VIT C. Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz. Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação das ER e espécies não radicalares ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Nossos achados demonstram a eficiência do sistema antioxidante de defesa endógeno dos animais na neutralização das ER, uma vez que observamos um aumento

na geração de ER apenas no coração dos ratos com periodontite apical. Essa modulação do sistema antioxidante de defesa endógeno observada em nossos resultados suportam dados da literatura que mostram que pacientes com inflamação periapical apresentam níveis séricos aumentados de VIT C (SHETTY; KUMARI, 2012) e ratos com lesão periapical demonstraram redução nos níveis de glutathione sanguínea (BERAR et al., 2015). Como salientado anteriormente, o sistema antioxidante de defesa endógeno não foi capaz de conter a alta geração de ER cardíacas induzidas pela periodontite apical, demonstrando a vulnerabilidade desse órgão frente a infecção endodôntica. Recentemente, Inchingolo et al. (2014) já demonstraram que o estresse oxidativo gerado pela periodontite apical aumenta o risco de indivíduos que apresentam essa infecção a desenvolverem doenças sistêmicas, revelando que a infecção endodôntica pode influenciar a saúde sistêmica (MARTON et al., 1993), o que está de acordo com nossos resultados.

Além disso, a periodontite apical afetou a atividade da NKA no coração, fígado e pâncreas de ratos adultos, indicando um desequilíbrio do gradiente eletroquímico através da membrana plasmática desses órgãos. No coração, observamos um aumento da atividade da NKA. Juntamente com a disfunção mitocondrial e a geração de ER, a expressão alterada de várias proteínas sinalizadoras pode prejudicar a função cardíaca (TAKIMOTO; KASS, 2007). A NKA é um importante transportador de íons através do sarcolema e, portanto, desempenha um papel importante no controle da função elétrica e contrátil do miocárdio (SCHWINGER et al., 2003), além de ser um alvo validado para a regulação de várias condições cardíacas (SEHIRLI et al., 2015). A redução da atividade da NKA cardíaca leva à disfunção contrátil, à geração de arritmias e à insuficiência cardíaca (SCHWINGER et al., 2003). No entanto, o aumento ou a normalização da sua atividade no coração pode ser responsável pela atenuação da hipertrofia cardíaca e da remodelação (KHATUA et al., 2017). Já foi demonstrado que um ativador de NKA foi capaz de proteger as células do miocárdio contra lesões celulares induzidas pela glicose e apoptose por meio da redução do nível de ER, inibição da peroxidação lipídica, redução da sobrecarga de cálcio (YAN et al., 2017). No coração, o aumento da atividade da NKA já foi relacionado à redução da toxicidade e da inflamação (GUO et al., 2016; OBRADOVIC et al., 2014), além da regulação da contratilidade cardíaca, atenuando a lesão celular do miocárdio (XU et al., 2005; ZHENG et al., 2011).

No fígado, o aumento da atividade da NKA pode estar relacionado à manutenção da estabilidade do volume da matriz e dos níveis intracelulares de cálcio, além do impedimento da ocorrência de lesão hipóxico-isquêmica. Como o fígado desempenha um papel principal na manutenção da homeostase metabólica e é um órgão essencial para a resposta ao estresse (MA

et al., 2020), o aumento na atividade da NKA observado nos animais com periodontite apical pode ser um mecanismo de proteção hepático frente à infecção microbiana.

No pâncreas, a atividade da NKA é responsiva a múltiplos fatores metabólicos e hormonais. Já foi demonstrado que a glicose pode ativar (ELMI et al., 2000) e inibir (OWADA et al., 1999) a bomba de sódio. Presume-se que a insulina ative a NKA por vários mecanismos, incluindo o aumento do influxo e da sensibilidade aumentada ao sódio, e de alterações na translocação, fosforilação ou biossíntese (revisado em SWEENEY; KLIP, 1998). A leptina e o peptídeo C também estimulam a atividade da NKA (SWEENEY; KLIP, 2001; VAGUE et al., 2004). No primeiro experimento, a periodontite apical aumentou a atividade da NKA no pâncreas, o que pode estar relacionado ao processo inflamatório induzido pela infecção endodôntica. Essa ativação da NKA já foi demonstrada em condições inflamatórias (SWEENEY; KLIP, 1998), e pode culminar em hiperpolarização da membrana plasmática e na redução da sua atividade elétrica (RIBALET; BEIGELMAN, 1982).

Contudo, a periodontite apical não alterou a atividade renal da NKA. Os eletrólitos têm um papel importante na manutenção da homeostase no organismo. Nos mamíferos, os líquidos e eletrólitos são distribuídos nos comportamentos intra e extracelulares, cuja manutenção de volume e composição é essencial para os processos metabólicos fundamentais à vida. O sódio e o potássio são eletrólitos componentes essenciais dos fluidos corporais, como o sangue e a urina, e ajudam a regular a distribuição de água no organismo, além de desempenhar um papel importante no equilíbrio ácido-base (STIVANIN, 2014). Nesse contexto, o rim é o órgão mais importante na regulação do volume e da composição dos fluidos corporais, mesmo que outros órgãos, como o coração e o fígado, auxiliem na manutenção do equilíbrio eletrolítico. Já foi demonstrado que a presença de uma infecção bacteriana pode alterar a permeabilidade iônica da membrana celular (KONG et al., 2017), no entanto isso não foi observado nesse estudo, uma vez que a atividade da NKA renal dos animais com periodontite apical não demonstrou diferença em relação ao grupo controle.

A NKA é uma enzima cotransportadora integral de membrana que acopla a hidrólise de ATP ao transporte de íons sódio e potássio através da membrana plasmática de todas as células animais (KYTE, 1981). A NKA é o principal sistema que contribui para restaurar o equilíbrio dos íons sódio e potássio através da membrana plasmática, auxilia na manutenção do potencial de repouso e regula o volume celular (HUIGSLOOT et al., 2002), evita a sobrecarga intracelular de cálcio, sustenta a estabilidade do volume da matriz e inibe eventos de isquemia e hipóxia; exercendo, assim, efeitos protetores teciduais (LI e al., 2015). A ativação da NKA está relacionada ao aumento desse transporte ativo de sódio e potássio e, conseqüentemente, ao

aumento da taxa de hidrólise do ATP. Ademais, a ativação da NKA tem sido associada à preservação da atividade enzimática frente ao processo de desnaturação (XU et al., 2005), que pode ocorrer na presença de um processo patológico (SARTORI et al., 2017). Durante a ativação da NKA não foram detectadas alterações significativas na afinidade para o sódio e o potássio, sugerindo que o modo enzimático para o sistema de transporte desses íons é o mesmo durante a atividade normal da enzima (XU et al., 2005). Tomados em conjunto, esses dados sugerem que o aumento da atividade da NKA, induzida pela periodontite apical, é uma tentativa dos órgãos de se protegerem contra os efeitos nocivos induzidos pela infecção endodôntica. Além disso, a periodontite apical incitou uma resposta antioxidante endógena no coração, fígado, pâncreas e rim. Esses achados indicam que uma alteração do gradiente eletroquímico celular pode estar envolvida na fisiopatologia da lesão periapical, modulando a atividade da NKA e o sistema antioxidante de defesa endógeno.

Na continuidade dos estudos, para verificar a existência da influência da idade e de diferentes tempos de exposição pulpar sobre os mesmos parâmetros analisados no primeiro experimento, um segundo protocolo experimental foi desenvolvido com ratos Wistar, machos, adultos jovens e três tempos de exposição pulpar, a saber, 7, 14 e 21 dias. Assim, o segundo experimento avaliou parâmetros de dano oxidativo e as atividades da NKA e da CAA em diferentes órgãos vitais de ratos jovens com periodontite apical. A exposição pulpar de molares é um modelo bem caracterizado e amplamente utilizado de periodontite apical experimental em ratos (CINTRA et al., 2014a; b; c; SCARPARO et al., 2011; WOLLE et al., 2012; 2013). Neste estudo, a periodontite apical foi induzida com sucesso em ratos Wistar através da abertura oclusal do primeiro molar mandibular direito até a exposição pulpar, como observado radiograficamente pela área radiolúcida apical desse dente do grupo periodontite apical no 21º dia experimental.

A presença de periodontite apical no primeiro molar mandibular direito foi associada ao aumento dos danos oxidativos no coração, fígado e pâncreas, expresso pelo aumento da geração das ER e marcadores de oxidação lipídica e proteica, os quais foram capazes de causar alterações significativas sobre as ATPases, cuja a redução das atividades reflete a extensão do dano observado nos diferentes órgãos. Estudos anteriores mostram que a oxidação de lipídios e proteínas pode levar a degeneração da membrana celular, alterando sua permeabilidade e inativando enzimas ligadas às membranas, culminando na morte celular (BUS; GIBSON, 1979; GIROTTI, 1990; SCHARFFETTER-KOCHANEK et al., 1997; SUN, 1990), concordando com nossos resultados.

A atividade das ATPases configura um fator importante para os processos de sinalização celular através da manutenção do gradiente eletroquímico transmembrana (MOSELEY et al., 2007; STAHL; HARRIS, 1986). Uma vez que a sua atividade é sensivelmente modificada pelo estresse oxidativo (TEIXEIRA et al., 2011; 2012; LIMA et al., 2009), alterações na atividade dessas enzimas podem representar um importante marcador de toxicidade (CHAUDHARY; PARVEZ, 2012; LEES, 1993). Neste contexto, a avaliação das atividades da NKA e da CAA cardíacas, hepáticas e pancreáticas constituiu uma ferramenta para estimar os efeitos nocivos sistêmicos da periodontite apical. Assim, no segundo experimento, observamos uma redução significativa das atividades dessas enzimas nos animais com periodontite apical. Como consequência, essa diminuição das atividades da NKA e da CAA pode afetar diretamente a manutenção da homeostase celular, o gradiente eletroquímico através da membrana plasmática, aos potenciais de ação, bem como a contração muscular e a liberação de hormônios (HERCHUELZ; PACHERA, 2018; JAMME et al., 1995; LI, STYS, 2001; LEES et al., 1990; PARI; MURUGAVEL, 2007). Além disso, as ATPases parecem ser particularmente sensíveis aos danos induzidos pelas ER, uma vez que a redução das suas atividades têm sido associadas a alterações na composição lipídica da membrana plasmática (DENCHER et al., 2007) e no estado redox de grupos sulfidríla de antioxidantes endógenos (PARI; MURUGAVEL, 2007). Assim, acreditamos que a presença de periodontite apical em um dente foi suficiente para causar alterações funcionais no coração, fígado e pâncreas, as quais estão fortemente relacionadas aos danos oxidativos induzidos pela infecção endodôntica. Esse achado está de acordo com Cintra et al. (2018), que analisou a literatura atual e mostrou uma associação entre a infecção endodôntica e alterações sistêmicas.

Surpreendentemente, observamos diferentes influências da periodontite apical sobre a atividade das ATPases quando consideramos os experimentos 1 e 2. A presença de periodontite apical em ratos machos e adultos foi relacionada ao aumento da atividade da NKA e à redução das atividades da NKA e da CAA em ratos machos jovens em diferentes órgãos, respectivamente. Tem sido demonstrado que a idade é um dos fatores importantes na determinação do curso e das consequência de diferentes infecções. Correlações entre idade, sexo, grau de morbidade e patologia foram encontradas, e as citocinas emergiram como possíveis mediadores para essas observações (MORALES MONTOR; HALL, 2007). Durante processos infecciosos, a interação entre os sistemas imune e endócrino na coordenação das respostas configura uma reação de defesa generalizada e adaptativa (PÉREZ et al., 2011). Tal reação é caracterizada por mediadores inflamatórios, capazes de exercer efeitos marcantes sobre o sistema endócrino que, por sua vez, afeta a liberação de citocinas. Além disso, uma resposta

imunoendócrina inadequada pode prejudicar a erradicação de patógenos causadores de doenças (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; PÉREZ et al., 2009a; ROGGERO et al. 2009). Nesse contexto, já foi demonstrado que ratos machos e jovens são mais suscetíveis à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* que ratos machos e adultos. Além da imaturidade do sistema imunológico observado em ratos machos e jovens, esses animais apresentaram valores de parasitemia significativamente mais altos e um padrão endócrino caracterizado por valores elevados nos níveis de corticosterona e na razão corticosterona/desidroepiandrosterona-sulfato, o que favorece a imunossupressão e a suscetibilidade. Por outro lado, ratos machos e adultos foram capazes de restringir a carga parasitária, o que provavelmente resultou do aumento da síntese de anticorpos como a imunoglobulina G (IgG) e dos níveis de estradiol. Os ratos adultos também mostraram uma relação fator de necrose tumoral α (do inglês *tumoral necrosis factor*, TNF- α) / interleucina 10 (IL-10) reduzida e menores danos aos tecidos. Assim, ratos jovens exibiram maior vulnerabilidade à infecção por *Trypanosoma cruzi* em comparação aos adultos e isso pode estar associado a um meio imunoendócrino inadequado. Tal estudo mostrou que a resistência à infecção observada em ratos machos e adultos está associada a um cenário imunoendócrino compatível com um estado protetor e compensado (PÉREZ et al., 2011), o que concorda com nossos achados.

Com base nos dois experimentos que abrangem essa tese, os estudos realizados sugerem que a consequência da colonização microbiana dos canais radiculares dos dentes que ocorrem a partir da exposição pulpar causada, primariamente, por cárie ou trauma, denominada periodontite apical, pode modificar os padrões de dano e os mecanismos de defesa endógeno, predispondo para o desenvolvimento e/ou agravamento de alterações sistêmicas. Tal situação é especialmente preocupante uma vez que o envelhecimento da população mundial é uma tendência irreversível e está associada ao aumento das doenças crônicas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015). No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a mais recente Projeção de População estimou que a proporção de idosos na população deverá ultrapassar a de crianças e adolescentes a partir de 2040. Em 2060, segundo o estudo, um quarto da população brasileira (25,55%) terá mais de 65 anos (IBGE, 2015). As consequências disso para a saúde, para os sistemas de saúde, seus orçamentos e para os trabalhadores de saúde serão profundas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015).

5 CONCLUSÕES

Tomados em conjunto, os resultados apresentados nesta tese demonstram a ação deletéria da periodontite apical sobre as ATPases em diferentes órgãos de ratos machos, cujas atividades podem ser influenciadas pela idade e tempo de infecção endodôntica, que configurou o maior achado desse estudo. Além disso, demonstramos que a presença da lesão periapical modulou o sistema de defesa antioxidante endógeno do coração, fígado, pâncreas e rim. Estudos prévios mostram que a atividade das ATPases e do sistema de defesa antioxidante endógeno se relacionam diretamente com fatores internos como os diferentes comprometimentos sistêmicos, nomeadamente as doenças cardiovasculares (BELLIARD et al., 2016), renais (VENUGOPAL et al., 2017), hepáticas (DOLCI et al., 2017), além do diabetes (WOLLE et al., 2013) e distúrbios hormonais (BRASIL et al., 2017); e externos, como os antioxidantes exógenos (WOLLE et al., 2012) ou componentes dietéticos, como os ácidos graxos poli-insaturados n-3 (AZUMA et al., 2017). Tais fatores alteram a resposta do hospedeiro frente aos danos relacionados à infecção endodôntica, interferindo no seu curso, podendo conferir proteção (AZUMA et al., 2017; WOLLE et al., 2012) ou facilitar a progressão (ASTOLPHI et al., 2013) dessa desordem dentária.

Além disso, é possível sugerir que a periodontite apical, uma inflamação e destruição dos tecidos periapicais causados pela infecção microbiana da polpa dental (NAIR, 2004; VERNAL et al., 2006), pode ser relacionada ao aumento da atividade da NKA em ratos adultos e à redução das atividades da NKA e da CAA em ratos jovens em sítios distantes da lesão periapical. Então, podemos inferir que o aumento na atividade da NKA agiu como um mecanismo de proteção frente ao processo de desnaturação enzimática induzida por processos patológicos (BELLIARD et al., 2016; CHOUDHARY; BODAKHE, 2016; LI et al., 2015) dos ratos machos e adultos. No entanto, a redução nas atividades da NKA e da CAA indicam a influência deletéria da periodontite apical sobre as macromoléculas celulares, como comprovado pelo aumento dos níveis de peroxidação lipídica e proteica observado nos ratos machos e jovens. Além disso, a partir dos resultados aqui demonstrados, é possível propor que a periodontite apical modifica a atividade/níveis de antioxidantes endógenos, indicando um desequilíbrio entre a produção e a eliminação de metabólitos gerados pela injúria endodôntica. Neste contexto, podemos confirmar que as ER geradas pela ativação de células fagocíticas presentes na lesão periapical podem contribuir para a injúria tecidual periapical e para a reabsorção óssea, além de alterar a atividade das ATPases em órgãos vitais, o que pode ocasionar implicações sistêmicas. Cada órgão do corpo humano constitui um sistema e atua de

forma específica para desempenhar uma determinada função, garantindo o funcionamento integrado do organismo. Assim, observamos que cada órgão estudado possui sua suscetibilidade e sua proteção frente às injúrias (VANI et al., 2013), respondendo diferentemente à periodontite apical. Além disso, podemos propor que o estresse oxidativo e a consequente alteração no gradiente eletroquímico celular podem estar envolvidos na patogênese da periodontite apical. Os resultados dos estudos realizados até agora no campo da Endodontia indicam que o estado de saúde periapical está associado ao estado de saúde sistêmico.

REFERÊNCIAS

- ABELLA, F. et al. An evaluation of the periapical status of teeth with necrotic pulps using periapical radiography and cone-beam computed tomography. **International Endodontics Journal**, v. 47, p. 387-96, 2014.
- ABBOTT, P.V. Classification, diagnosis and clinical manifestations of apical periodontitis. **Endodontic Topics**, v. 8, p. 36-54, 2004.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, p. 105- 121, 1984.
- AL-AWQATI, Q. H⁺ transport in urinary epithelia. **American Journal of Physiology**, v. 235, p. F77-F88, 1978.
- AMAR, S.; HAN, X. The impact of periodontal infection on systemic diseases. **Medical Science Monitor**, v. 9, p. 291-299, 2003.
- AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS. **Guide to Clinical Endodontics**. 2013. Disponível em: <<http://www.aae.org/speciality/clinical-resources/guide-clinical-endodontics/>>. Acesso em: 30 fevereiro 2020.
- AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS. **Oral disease and systemic health: what is the connection?** Endodontics: Colleagues for Excellence; Spring/Summer 2000.
- AMES, B. Micronutrients prevent cancer and delay aging. **Toxicological Letters**, v.102, p. 5-18, 1998.
- ANDERSON, D. Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v.350, p.103-108, 1996.
- ANDERSON, G. et al. Role of immune-inflammatory and oxidative and nitrosative stress pathways in the etiology of depression: therapeutic implications. **CNS Drugs**, v. 28, p. 1-10, 2014.
- APELL, H. Does the Sodium Pump have Secret Levels? **Biophysical Journal**, v. 106, p. 2552-2554, 2014.
- ARMADA-DIAS, L. et al. Development of perirradicular lesions in normal and diabetic rats. **Journal of Applies Oral Science**, v. 14, n. 5, p. 371-5, 2006.
- ASTOLFI, R.D. et al. Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. **Journal of Endodontics**, v. 39, 648-652, 2013
- ATKINSON, A.; GATENBY, A.D.; LOWE, A.G. The determination of inorganic orthophosphate in biological systems. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 320, p. 195-204, 1973.
- AZUMA, M.M. et al. Omega 3 fatty acids reduce the triglyceride levels in rats with apical periodontitis. **Brazilian Dental Journal**, v. 29, p. 173-178, 2018a.

AZUMA, M.M. et al. Omega-3 fatty acids reduce inflammation in rat apical periodontitis. **Journal of Endodontic**, v. 44, p. 604-608, 2018.

AZUMA, M.M. et al. Omega 3 fatty acids reduce bone resorption while promoting bone generation in rat apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 43, p. 970-976, 2017.

AZUMA, M.M. et al. Diabetes increases interleikin-17 levels in periapical, hepatic, and renal tissues in rats. **Archives of Oral Biology**, v. 83, p. 230-235, 2017.

BAHEKAR, A.A. et al. The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. **America Heart Journal**, v. 154, p. 830-7, 2007.

BARON, R. Molecular Mechanisms of Bone Resorption by the Osteoclast. **Anatomical Record**, v. 224, p. 317-324, 1989.

BARON, R. et al. Polarized secretion of lysosomal enzymes: co-distribution of cation independent mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzymes in the osteoclast exocytic pathway. **Journal of Cell Biology**, v. 106, p.1863-1872, 1988.

BARON, R. et al. Evidence for a high and specific concentration of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPase}$ in the plasma membrane of the osteoclast. **Cell**, v. 46, p. 311-320, 1986.

BATTINO, M.; FERREIRO, M.S.; FATTORINI, D.; BULLON, P. *In vitro* antioxidant activities of mouth rinses and their components. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, p. 462-67, 2002.

BATTINO, M. et al. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: The challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 10, p. 458-476, 1999.

BEAL, M.F.; HYMAN, B.T.; KOROSHETZ, W. Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? **Trends in Neuroscience**, v. 16, p. 125-131, 1993.

BÉGUIN, P. et al. The γ subunit is a specific component of the $\text{Na}, \text{K}-\text{ATPase}$ and modulates its transport function. **The EMBO Journal**, v. 16, p. 4250-4260, 1997.

BEKKER, J.; GAY C.V. Characterization of a $\text{Ca}^{2+}-\text{ATPase}$ in osteoclast plasma membrane. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 5, p. 557-67, 1990.

BELLIARD, A. et al. Ischemia/reperfusion-induced alterations of enzymatic and signaling functions of the rat cardiac $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$: protection by ouabain preconditioning. **Physiological Reports**, v. 4, p. e12991, 2016.

BENAIM, G. La $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$ de la membrana plasmática como enzima clave em la homeostasis del calcio. Estimulación por etanol y otros efectores. **Acta Científica Venezolana**, v. 55, p. 304-314, 2004.

BENAIM, G. et al. Ethanol stimulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1195, p. 141-148, 1994.

BENAIM, G. et al. A calmodulin-stimulated Ca^{2+} pump in plasma membrane vesicles from *Trypanosoma brucei*. Selective inhibition by pentamidine. **Biochemical Journal**, v. 296, p. 759-763, 1993.

BENAIM, G. Homeóstasis intracelular del calcio. La calmodulina y la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de tripanosomatídeos. **Acta Científica Venezolana**, v. 44, p. 57-66, 1993.

BENAIM, G. et al. A calmodulin-activated (Ca^{2+} - Mg^{2+})-ATPase is involved in calcium transport by plasma membrane vesicles from *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, v. 280, p. 715-720, 1991.

BENAIM, G.; de MEIS, L. Similarities between the effects of dimethyl sulfoxide and calmodulin on the red cell Ca^{2+} -ATPase. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1026, p. 87-92, 1990.

BENAIM, G.; de MEIS, L. Activation of the purified erythrocyte plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by organic solvents. **FEBS Letters**, v. 244, p. 484-486, 1989.

BENAIM, G.; VILLALOBO, A. Phosphorylation of Calmodulin: Functional Implications. (Review). **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 3619-3631, 2002.

BERAR, A.M. et al. Analysis of hematological and oxidative stress parameters in the evaluation of experimentally induced periapical lesions. **Human Veterinary Medicine**, v. 7, p. 162-167, 2015.

BERGENHOLTZ, G.; HORSTED-BINDSLEV, P.; REIT, C. (editors). Textbook of Endodontology. 2nd Edition. Chichester: WileyBlackwell, 2010.

BERK, M. et al. So depression is an inflammatory disease, but where does the inflammation come from? **BMC Medicine**, v. 11, p. 1-16, 2013.

BERLIN-BRONER, Y.; FEBBRAIO, M.; LEVIN, L. Association between apical periodontitis and cardiovascular diseases: a systematic review of the literature. **International Endodontic Journal**, v. 50, p. 847-59, 2017.

BERLINCK, T. et al. Epidemiological evaluation of apical periodontitis prevalence in an urban Brazilian population. **Brazilian Oral Research**, v. 29, p. 1-7, 2015.

BILLINGS, F. Focal infection: its broader application in the etiology of disease. **JAMA**, p. 899-903, 1914.

British Dental Association. **Endodontic treatment and general health**; April 1996.

BOUCHER, Y. et al. Radiographic evaluation of the prevalence and technical quality of root canal treatment in a French subpopulation. **International Endodontic Journal**, v. 35, p. 229-38, 2002.

BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. **Medicina**, v. 58, p. 350-356, 1998.

BOYNE, A.F.; ELLMAN, G.L. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. **Analytical Biochemistry**, v. 46, p. 639, 1972.

BRASIL, S.C. et al. Influence of oestrogen deficiency on the development of apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 50, p. 161-166, 2017.

BUS, J.S.; GIBSON, J.E. Gibson. Lipid peroxidation and its role in toxicology. **Review Biochemistry Toxicology**, v. 1, p. 125-149, 1979.

CANTLEY, L.C. 1981 Structure and mechanism of the Na⁺,K⁺ATPase. **Current Topics in Bioenergetics**, v. 11, p. 201-237, 1981.

CARAFOLI, E. Intracellular calcium homeostasis. **Annual Review Biochemistry**, v. 56, p. 395-433, 1987.

CARAFOLI, E. The Ca²⁺ pump of the plasma membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 2115- 2118, 1992.

CARFAGNA, M.A.; PONSLEER, G.D.; MUHOBERAC, B.B. Inhibition of ATPase activity in rat synaptic plasma membranes by simultaneous exposure to metals. **Chemical-Biological Interactions**, v. 100, p. 53-65, 1996.

CERUTTI, A.A. Oxidant stress and carcinogenesis. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 21, p. 1-11, 1991.

CARROTTE, P. Endodontics: part 3. Treatment of endodontic emergencies. **British Dental Journal**, v. 197, p. 299-305, 2004.

CESARONE, M.R. et al. Variations in plasma free radicals in patients with venous hypertension with HR: a clinical, prospective, placebo-controlled, randomized trial. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 7, p. 25-8, 2002.

CHAPPLE, I.L. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 24, p. 287-96, 1997.

CHEN, D. et al. Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase induces hybrid cell death and enhanced sensitivity to chemotherapy in human glioblastoma cells. **BMC Cancer**, v. 14, p. 716, 2014.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Bioquímica Ilustrada**. Porto Alegre: Editora Artes médicas, 2000. 446 p.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, p. 527-605, 1979.

CHOUDHARY, R.; BODAKHE, S.H. Magnesium taurate prevents cataractogenesis via restoration of lenticular oxidative damage and ATPase function in cadmium chloride-induced

hypertensive experimental animals. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 836-844, 2016.

CINTRA et al. Endodontic medicine: interrelationships among apical periodontitis, systemic disorders, and tissue responses of dental materials. **Brazilian Oral Research**, v. 32, p. e68, 2018.

CINTRA, L.T. A. et al. Oral health, diabetes, and body weight. **Archives of Oral Biology**, v. 73, p. 94-99, 2017.

CINTRA, L.T.A. et al. Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. **Journal of Endodontics**, v. 42, p. 747-751, 2016.

CINTRA, L.T. A. et al. Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. **Journal of Endodontics**, v. 40, p. 1139-1144, 2014a.

CINTRA, L.T. A. et al. Apical periodontitis and periodontal disease increase serum IL-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. **Clinical Oral Investigation**, v. 18, p. 2123-2128, 2014b.

CINTRA, L.T. A. et al. Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. **International Endodontic Journal**, v. 47, p. 228-237, 2014c.

CINTRA, L.T. et al. Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats. **Clinical Oral Investigation**, v. 17, p. 1595-1599, 2013.

CLARK, T.A. et al. Oxidative stress and its implications for future treatments and management of Alzheimer disease. **International Journal of Biomedical Science**, v. 6, p. 225-227, 2010.

COELHO-SAMPAIO, T. et al. Dissociation of purified erythrocyte Ca^{2+} -ATPase by hydrostatic pressure. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 22266-22272, 1991.

CORNELUIS, F. Functional reconstitution of the sodium pump. Kinetics of exchange reactions performed by reconstituted Na/K-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1071, p. 19-66, 1991.

CORTELEZZI, A. et al. Hyperhomocysteinemia in myelodysplastic syndromes: specific association with autoimmunity and cardiovascular disease. **Leukemia & Lymphoma**, v. 41, p. 147-50, 2001.

COSME-SILVA, L. et al. Systemic administration of probiotics reduces the severity of apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 52, p. 1738-1749, 2019.

COTTI, E.; MERCURO, G. Apical periodontitis and cardiovascular diseases: previous findings and ongoing research. **International Endodontic Journal**, v. 48, p. 926-32, 2015.

COTTI, E. et al. Can a chronic dental infection be considered a cause of cardiovascular disease? A review of the literature. **International Journal of Cardiology**, v. 148, p. 4-10, 2011a.

COTTI, E. et al. Association of endodontic infection with detection of an initial lesion to the cardiovascular system. **Journal of Endodontics**, v. 37, p. 1624-9, 2011b.

D'AIUTO, F. et al. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. **Journal of Dental Research**, v. 89, p. 1241-1246, 2010

DE CLEEN, M.J. et al. Periapical status and prevalence of endodontic treatment in an adult Dutch population. **International Endodontic Journal**, v. 26, p. 112-9, 1993.

DE MOOR, R.J.G. et al. Periapical health related to the quality of root canal treatment in a Belgian population. **International Endodontics Journal**, v. 33, p. 113-20, 2000.

DENCHER, N.A. et al. Proteome alterations in rat mitochondria caused by aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1100, p. 291-298, 2007.

DEZEREGA, A. et al. Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response **Journal of Inflammation**, v. 9, p. 1-9, 2012.

DI FILIPPO, G.; SIDHU, S.K.; CHONG, B.S. Apical periodontitis and the technical quality of root canal treatment in an adult sub-population in London. **Brazilian Dental Journal**, v. 216, p. E22, 2014.

DIGIESI, V. et al. Reactive metabolites of oxygen, lipid peroxidation, total antioxidant capacity and vitamin E in essential arterial hypertension. **Clinical Therapeutics**, v. 148, p. 515-519, 1997.

DOLCI et al. Hypoxia acclimation and subsequent reoxygenation partially prevent Mn-induced damage in silver catfish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 191, p. 52-62, 2017.

DUTTA, A.; SMITH-JACK, F.; SAUNDERS, W.P. Prevalence of periradicular periodontitis in a Scottish subpopulation found on CBCT images. **International Endodontics Journal**, v. 47, p. 854-63, 2014.

EBADI, M.; SRINIVASAN, S.K.; BAXI, M.D. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 48, p. 1-19, 1996.

ELBIM, C.; LIZARD, G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. **Cytometry A**, v.75, p. 475-81, 2009.

ELMI, A. et al. D-glucose stimulates the Na⁺/K⁺ pump in mouse pancreatic islet cells. **International Journal Experimental Diabetes Research**, v. 1, p. 155-164, 2000.

ERIKSEN, H.M. et al. Changes in endodontic status 1973-1993 among 35-year-olds in Oslo, Norway. **International Endodontic Journal**, v. 28, p. 129-32, 1995.

ERMAK, G.; DAVIES, K.J.A. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 713-721, 2002.

ESTRELA, C. et al. Diagnostic and clinical factors associated with pulpal and periapical pain. **Brazilian Dental Journal**, v. 22, p. 306-11, 2011.

FERREIRA, L.L. et al. Diabetic rats present high mean platelet count in the presence of oral infections. **Brazilian Dental Journal**, v. 28, p. 548-551, 2017.

FERREIRO-VERA, C. et al. Standard operation protocol for analysis of lipid hydroperoxides in human serum using a fully automated method based on solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry in selected reaction monitoring. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 6720-6, 2011.

FIGDOR, D. Apical periodontitis: a very prevalent problem. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 94, p. 651-2, 2002.

FIGDOR, D. **Microbial aetiology of endodontic treatment failure and pathogenic properties of selected species**. Umeå University Odontological Dissertations No. 79. Umeå (Sweden): Umeå University; 2002.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidant, oxidative stress and biology of ageing. **Nature**, v. 408, p.239-47, 2000.

FOLMER, V. et al. High sucrose consumption potentiates the sub-acute cadmium effect on Na⁺/K⁺-ATPase but not on δ-aminolevulinatase dehydratase in mice. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 333-341, 2004.

FOUAD, A.F. Diabetes mellitus as a modulating factor of endodontic infections. **Journal of Dental Education**, v. 67, p. 459-67, 2003.

FOUAD, A.F.; BURLESON, J. The effect of diabetes mellitus on endodontic treatment outcome: data from an electronic patient record. **The Journal of American Dental Association**, v. 134, p. 117-8, 2003.

FRISK, F.; HAKEBERG, M. A 24-year follow-up of root filled teeth and periapical health amongst middle aged and elderly women in Göteborg, Sweden. **International Endodontic Journal**, v. 38, p. 246-254, 2005.

GALLEY, H.; DAVIES, M.J.; WEBSTER, N.R. Ascorbil radical formation in patients with sepsis: effects of ascorbate loading. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 139-43, 1996.

GARG, P; CHAMAN, C. Apical periodontitis: is it accountable for cardiovascular diseases? **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, p. Ze08-12, 2016.

GAY, C.V.; ITO, M.B.; SCHRAER, H. Carbonic anhydrase activity in isolated osteoclasts. **Metabolic Bone Disease and Related Research**, v. 5, p. 33-39, 1983.

GAY, C.V.; MUELLER, W.J. Carbonic-anhydrase and osteoclasts: localization by labeled inhibitor autoradiography. **Science**, v. 183, p. 432-434, 1974.

GERARDI, G.M. et al. Plasma total antioxidant capacity in hemodialyzed patients and its relationship to other biomarkers of oxidative stress and lipid peroxidation. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, p. 104-110, 2002.

GERSCHMAN, R. et al. Oxygen poisoning and x-irradiation-A mechanism in common **Science**, v. 119, p. 623-26, 1954.

GHOTI, H. et al. Changes in parameters of oxidative stress and free iron biomarkers during treatment with deferasirox in iron-overloaded patients with myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, v. 95, p. 1433-4, 2010.

GIROTTI, A.W. Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. **Photochemistry and Photobiology**, v. 51, p. 497-509, 1990.

GIULIANA, G. et al. Occurrence of invading bacteria in radicular dentin of periodontally diseased teeth: microbiological findings. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 7, p. 478-485, 1997.

GLICKMAN, G.N. AAE Consensus Conference on Diagnostic Terminology: background and perspectives. **Journal of Endodontics**, v. 35, p. 1619-20, 2009.

GOLDMAN, S. S.; ALBERS, R. W. Sodium-Potassium-activated Adenosine Triphosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 248, p. 867-874, 1973.

GOMES, C. et al. Increased Root Canal Endotoxin Levels are Associated with Chronic Apical Periodontitis, Increased Oxidative and Nitrosative Stress, Major Depression, Severity of Depression, and a Lowered Quality of Life. **Molecular Neurobiology**, v. 55, p. 2814-2827, 2018.

GOMES, C. et al. Increased root canal endotoxin levels are associated with chronic apical periodontitis, increased oxidative and nitrosative stress, major depression, severity of depression, and a lowered quality of life. **Molecular Neurobiology**, v. 55, p. 2814-2827, 2018.

GOMES, M.S. et al. Apical periodontitis and incident cardiovascular events in the Baltimore longitudinal study of ageing. **International Endodontic Journal**, v. 49, p. 334-342, 2016.

GOMES, M.S. et al. Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? A systematic review and meta-analysis. **Journal of Endodontics**, v. 39, p. 1205-17, 2013.

GROVER, A.K.; SAMSON, S.E. Effect of superoxide radical on Ca²⁺ pumps of coronary artery. **American Journal of Physiology**, v. 255, p. C297-C303, 1988.

GROVER, A.K.; SAMSON, S.E.; FOMIN, V.P. Peroxide inactivates calcium pumps in pig coronary artery. **American Journal of Physiology**, v. 263, p. H537-H543, 1992.

GUEVARA, E.A.C. **Efeitos de um antipsicótico e um antidepressivo tricíclico sobre a bomba de sódio e potássio, Na⁺,K⁺-ATPase: Estudo através de fluorescência.** 2005. Dissertação – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

GUO, N. et al. Low-dose Exogenous Ouabain alleviates cardiac lipotoxicity through suppressing expression of CD36. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 67, p. 39-46, 2016.

GUYNN, S.R. et al. Identification of mRNA and protein expression of the Na/K-ATPase α 1-, α 2- and α 3-subunit isoforms in Antarctic and New Zealand nototheniid fishes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 273, p. 15-32, 2002.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 231-55, 2004.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 344, p. 721-4, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.** Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.** 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.

HARMAN, D. Free radical theory of aging, increase the functional life span. **Annals New York Academy Science**, v. 717, p. 1-15, 1994.

HEMPEL, S.L. et al. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-carboxy-2'-7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 146-159, 1999.

HERATH, T.D. et al. Heterogeneous *Porphyromonas gingivalis* LPS modulates immunoinflammatory response, antioxidant defense and cytoskeletal dynamics in human gingival fibroblasts. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-15, 2016.

HERCHUELZ, A.; PACHERA, N. The Na⁺/Ca²⁺ exchanger and the Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase in β -cell function and diabetes. **Neuroscience Letters**, v. 633, p. 72-78, 2018.

HILL, A.B. The Environment and Disease: Association or Causation? **Proceeding of the Royal Society of Medicine**, v. 58, p. 295-300, 1965.

HOMMEZ, G.M.G.; COPPENS, C.R.M.; DE MOOR, R.J.G. Periapical health related to the quality of coronal restorations and root filling. **International Endodontic Journal**, v. 35, p. 680-9, 2002.

HSU, C.C. et al. Association of periodontitis and subsequent depression: a nationwide population-based study. **Medicine**, v. 94, 2015.

HUIGSLOOT, M. ET AL. Differential regulation of doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis by Bcl-2 in mammary adenocarcinoma (MTLn3) cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 35869-35879, 2002.

HUJOEL, P.P. Does chronic periodontitis cause coronary heart disease? A review of the literature. **The Journal of American Dental Association**, v. 133, p. 31S-6, 2002.

ILHARA, Y.; KAGEYAMA, K.; KONDO, T. Overexpression of calreticulin sensitizes SERCA2a to oxidative stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 329, p. 1343-1349, 2005.

IMFELD, T.N. Prevalence and quality of endodontic treatment in an elderly urban population Switzerland. **Journal of Endodontics**, v. 17, p. 604-607, 1991.

INCANDELA, L. et al. Oxygen-free radical decrease in hypertensive patients treated with lercanidipine. **International Angiology**, v. 20, p. 136-40, 2001.

INCHINGOLO, F. et al. Influence of endodontic treatment on systemic oxidative stress. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, p. 1-6, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Projeção da população do Brasil e Unidades da Federação**. 2015. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>>. Acesso em: 20 fevereiro 2020.

IORIO, E.L.; QUAGLIUOLO, L.; CARRATELLI, M. The d-ROMs test: a method to monitor oxidative stress in vascular diseases. **Minerva Cardioangiologia**, v. 50, p. 143-4, 2002.

JACQUES-SILVA, M.C. et al. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Toxicology Applied Pharmacology**, v. 88, p. 119-25, 2001.

JAMME, I. et al. Modulation of mouse cerebral Na⁺,K(+)-ATPase activity by oxygen free radicals. **Neuroreport**, v. 7, p. 333-337, 1995.

JENNER, P.; OLNAW, C.W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 47, p. S161-S176, 1996.

JENSEN, T.P.; BUCKBY, L.E.; EMPSON, R.M. Expression of plasma membrane Ca²⁺ATPase family members and associated synaptic proteins in acute and cultured organotypic hippocampal slices from rat. **Developmental Brain Research**, v. 152, p. 129-136, 2004.

JIMÉNEZ-PINZÓN, A. et al. Prevalence of apical periodontitis and frequency of root-filled teeth in an adult Spanish population. **International Endodontic Journal**, v. 37, p. 167-73, 2004.

JORGENSEN, P.L. Mechanism of the Na⁺, K⁺ pump protein structure and conformations of the pure (Na⁺ + K⁺)-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes**, v. 694, p. 27-68, 1982.

JORGENSEN, P.L.; HAKANSSON, K.O.; KARLISH, S.J. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. **Annual Review Physiology**, v. 65, p. 817-49, 2003.

JOSHIPURA, K.J. et al. Pulpal inflammation and incidence of coronary heart disease. **Journal of Endodontics**, v. 32, p. 99-103, 2006.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 20, p. 340-9, 1965.

KAMBERI, B. et al. Prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment in a Kosovar adult population. **BMC Oral Health**, v. 11, p. 32, 2011.

KAMBOJ, S.S.; SANDHIR, R. Protective effect of N-acetylcysteine supplementation on mitochondrial oxidative stress and mitochondrial enzymes in cerebral cortex of streptozotocin-treated diabetic rats. **Mitochondrion**, v. 11, p. 214-22, 2011.

KANAI, R.; OGAWA, H.; TOYOSHIMA, C. Crystal structure of a Na⁺-bound Na,K-ATPase preceding the E1P state. **Nature**, v. 502, p. 201-206, 2013.

KARP, Gerald. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos**. Barueri, SP: Manole, 2005. p. 159.

KHATUA, T.N. et al. Novel Sulfur Metabolites of Garlic Attenuate Cardiac Hypertrophy and Remodeling through Induction of Na⁺/K⁺-ATPase Expression. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 1-11, 2017.

KAUR, J.; SHARMA, D.; SINGH, R. Acetyl-L-carnitine enhances Na⁺K⁺-ATPase glutathione-S-transferase and multiple unit activity and reduces lipid peroxidation and lipofuscin concentration in aged brain regions. **Neuroscience Letters**, v. 301, p. 1-4, 2001.

KAWAKAMI, K. et al. Primary structure of the alpha-subunit of *Torpedo californica* (Na⁺+K⁺) ATPase deduced from cDNA sequence. **Nature**, v. 316, p. 733-736, 1985.

KHALIGHINEJAD, N. et al. Association between systemic diseases and apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 42, p. 1427-34, 2016.

KHATUA, T.N. Novel Sulfur metabolites of garlic attenuate cardiac hypertrophy and remodeling through Induction of Na⁺/K⁺-ATPase expression. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 1-11, 2017.

KINANE, D.F.; LOWE, G. How periodontal disease may contribute to cardiovascular disease. **Periodontology 2000**, v. 23, p. 121-126, 2000.

KONG, W.G. et al. A study of the damage of the intestinal mucosa barrier structure and function of *Ctenopharyngodon idella* with *Aeromonas hydrophila*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 1223-1235, 2017.

KRIEGER, N.S.; TASHJIAN, A.H. Parathyroid hormone stimulates bone resorption via a Na-Ca exchange mechanism. **Nature**, v. 287, p. 843-845, 1980.

KÜHLBRANDT, W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 282-95, 2004.

KUMAR, A. et al. Association of periodontal health indicators and major depressive disorder in hospital outpatients. **Journal of Indian Society Periodontology**, v. 19, p. 507-511, 2015.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KURELLA, E. et al. Kinetic parameters of Na/K-ATPase modified by free radicals in vitro and in vivo. **Annals of the New York Academy Sciences**, v.834, p. 661-665, 1997.

KYTE, J. Molecular considerations relevant to the mechanism of active transport. **Nature**, v. 292, p. 201-204, 1981.

LA TORRE, F. et al. Increase of oxygen free radicals and their derivatives in chemo- and radiation treated neoplasm patients. **Minerva Medica**, v. 86, p. 1-4, 1986.

LEES, G.J. Contributory mechanisms in the causation of neurodegenerative disorders. **Neuroscience**, v. 54, p. 287-322, 1993.

LEES, G.J. et al. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 120, p. 159-162, 1990.

LEONARDO, M.R. **Endodontia: conceito biológicos e recursos tecnológicos**. São Paulo: Artes Médicas, 2009. 616p.

LI, N. et al. Protective effect of Lai Fu Cheng Qi decoction on severe acute pancreatitis-induced myocardial injury in a rat model. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 9, p. 1133-1140, 2015.

LI, R. et al. Assessing mitochondrial redox status by flow cytometric methods: vascular response to fluid shear stress. **Current Protocols in Cytometry**, v. 9, 2011a.

LI, Z. et al. Na/K-ATPase mimetic pNaKtide peptide inhibits the growth of human cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 32394-32403, 2011a.

LI, S.; STYS, P.K. Na(+)-K(+)-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na(+)-dependent transport in spinal cord white matter. **Neuroscience**, v. 107, p. 675-683, 2001.

LIMA, S.M. et al. Diabetes mellitus and inflammatory pulpal and periapical disease: a review. **International Endodontic Journal**, v. 46, p. 700-9, 2013.

LIU, T. et al. A metaanalysis of oxidative stress markers in depression. **PLoS One**, v. 10, p. e0138904, 2015.

- LOCKHART, P.B. et al. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association? A scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 125, p. 2520-44, 2012.
- LOHR, J.B.; KUCZENSKI, R., NICULESCU, A.B. Oxidative mechanisms and tardive dyskinesia. **CNS Drugs**, v. 17, p. 47-62, 2003.
- LOWNDES, J.; HOKIN-NEAVERSON, M.; RUOHO, A. A photolabel for the human erythrocyte NaK-ATPase ouabain binding site. **Federation Proceedings**, v. 43, p. 3698, 1984.
- LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the folin Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MA, Q. et al. Effects of osmotic stress on Na⁺/K⁺-ATPase, caspase 3/7 activity, and the expression profiling of *sirt1*, *hsf1*, and *hsp70* in the roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 135-144, 2020.
- MA, T.Y. et al. Mechanism of extracellular calcium regulation of intestinal epithelial tight junction permeability: role of cytoskeletal involvement. **Microscopy Research & Technique**, v. 51, p. 156-168, 2000.
- MAES, M. et al. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, p. 676-692, 2011.
- MAES, M. et al. Multiple aberrations in shared inflammatory and oxidative & nitrosative stress (IO&NS) pathways explain the co-association of depression and cardiovascular disorder (CVD), and the increased risk for CVD and due mortality in depressed patients. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, p. 769-783, 2011.
- MARQUES, M.D.; MOREIRA, B.; ERIKSEN, H.M. Prevalence of apical periodontitis and results of endodontic treatment in an adult Portuguese population. **International Endodontic Journal**, v. 31, p. 161-5, 1998.
- MARTINS, C.M. et al. Relationship between hypertension and periapical lesion: an in vivo and in vitro study. **Brazilian Oral Research**, v. 30, p. e78, 2016.
- MARTON, IJ. et al. The role of reactive species oxygen intermediates in the pathogenesis of chronic apical periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 8, p. 254-7, 1993.
- MENEGHINI, R. Genotoxicity of active oxygen species in mammalian cells. **Mutation Research**, v. 195, p. 215-30, 1988.
- MI, S.F. et al. Na⁺/K⁺-ATPase β1 subunit interacts with M₂ proteins of influenza A and B viruses and affects the virus replication. **Science China Life Sciences**, v. 53, p. 1098-1105, 2010.
- MILLER, W. The human mouth as a focus of infection. **Dental Cosmos**, v. 33, p. 689-713, 1891.

MINCZYKOWSKI, A. et al. Hydrogen peroxide and superoxide anion production by polymorphonuclear neutrophils in patients with chronic periapical granuloma, before and after surgical treatment. **Clinical Oral Investigations**, v. 5, p. 6-10, 2001.

MINDIOLA, M.J. et al. Endodontic treatment in an American Indian population: a 10-year retrospective study. **Journal of Endodontics**, v. 32, p. 828-32, 2006.

MITCHELL, T.J.; ZUGARRAMURDI, C.; ARTIGAS, P. Sodium and proton effects on inward proton transport through Na/K pumps. **Biophysical Journal**, v. 106, p. 2555-2565, 2014.

MORENO, J.O. et al. Periradicular status and quality of root canal fillings and coronal restorations in an urban Colombian population. **Journal of Endodontics**, v. 39, p. 600-4, 2013.
MOSELEY, A.E. et al. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 616-626, 2007.

MOYLAN, S. et al. Oxidative & nitrosative stress in depression: why so much stress? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 45, p. 46-62, 2014.

MUSZBEK, L.; SZABÓ, T.; FÉSÜS, L. A highly sensitive method for the measurement of the ATP-ase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 77, p. 286-288, 1977.

NAIR, P.N. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, p. 348-381, 2004.

NIKI, E. Lipid antioxidants: How they may act in biological systems. **British Journal of Cancer**, v. 55, p. 153-157, 1987.

OBRADOVIC, M. *In vivo* effects of 17 β -estradiol on cardiac Na⁺/K⁺-ATPase expression and activity in rat heart. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 388, p. 58-68, 2014.

OFFENBACHER, S. Periodontal diseases: pathogenesis. **Annals Periodontology**, v. 1, p. 821-78, 1996.

OHKAWA, H.; OHISHI, N. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351, 1979.

OLIVEIRA, B. P. et al. Prevalence of endodontic diseases: an epidemiological evaluation in a Brazilian subpopulation. **Brazilian Journal of Oral Science**, v. 15, p. 119-123, 2016.

OLIVER, R.C.; HOLM-PEDERSEN, P.; LÖE, H. The correlation between clinical scoring, exudate measurements and microscopic evaluation of inflammation in the gingiva. **Journal of Periodontology**, v. 40, p. 201-209, 1969.

ONO, Y. et al. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B extracellular fragment shows neuroprotective effects and activates the PI3K/Akt and MEK/ERK pathways via the Na⁺/K⁺-ATPase. **Scientific Report**, v. 6, p. 23241, 2016.

OWADA, S. et al. Glucose decreases Na^+, K^+ -ATPase activity in pancreatic beta-cells. An effect mediated via Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 and protein kinase C-dependent phosphorylation of the alpha-subunit. **The Journal Biological Chemistry**, v. 274, p. 2000-2008, 1999.

PASQUINI A. et al. Analytical performances of d-ROMs test and BAP test in canine plasma. Definition of the normal range in healthy Labrador dogs. **Veterinary Research Communications**, v. 32, p. 137-43, 2008.

PATEL, S. Plant-derived cardiac glycosides: Role in heart ailments and cancer management. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1036-1041, 2016.

PATEL, S. et al. Antioxidants in Endodontics: A Strategic Review. **Journal of Clinical Diagnostic Research**, v. 9, p. ZE12-ZE15, 2015.

PEDERSEN, P.L.; CARAFOLI, E. Ion motive ATPases. I. Ubiquity properties, and significance to cell function. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 12, p. 146-150, 1987.

PIERRE, S. et al. *Ginkgo biloba* extract (Egb 761) protects Na^+K^+ -ATPase activity during cerebral ischemia in mice. **Neuroreport**, v. 10, p. 47-51, 1999.

PIZZO, G. et al. Dentistry and internal medicine: from the focal infection theory to the periodontal medicine concept. **European Journal of Internal Medicine**, v. 21, p. 496-502, 2010.

POST, R.L.; HEGYVARY, C.; KUME, S. Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. **The Journal Biological Chemistry**, v. 247, p. 6530-6540, 1972.

PRALLET, B. et al. Inhibition of sodium pumps by ouabain decreases bone resorption in fetal rat long bones and isolated rat osteoclast cultures. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 3, 1988.

PRIETO, A.K.C. et al. Influence of apical periodontitis on stress oxidative parameters in diabetic rats. **Journal of Endodontics**, v. 43, p. 1651-1656, 2017.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal for Vitam and Nutrition Research**, v. 67, p. 289-97, 1997.

QIN et al., Puerarin Suppresses $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase-mediated systemic inflammation and CD36 expression, and alleviates cardiac lipotoxicity in vitro and in vivo. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 68, p. 465-472, 2016.

RIBALET, B.; BEIGELMAN, P.M. Effects of sodium on beta-cell electrical activity. **American Journal of Physiology**, v. 242, p.C296-C303, 1982.

RIBEIRO, C.A. et al. Isovaleric acid reduces Na^+, K^+ -ATPase activity in synaptic membranes from cerebral cortex of young rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 27, p. 529-540, 2007.

RICE, W.J. et al. Structure of Na⁺,K⁺-ATPase at 11-Å Resolution: Comparison with Ca²⁺-ATPase in E₁ and E₂ States. **Biophysical Journal**, v. 80, p. 2187-2197, 2001.

ROCHETTE, L. et al. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1840, p. 2709-2729, 2014.

ROMERO, P.; ROMERO, E. The modulation of the calcium pump of human red cell by Na⁺ and K⁺. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 778, p. 245-52, 1984.

SARTORI, G. et al. Diphenyl diselenide reduces oxidative stress and toxicity caused by HSV-2 infection in mice. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, p. 1028-1037, 2017.

SCANNAPIECO, F.A. Position paper of the American Academy of Periodontology: periodontal disease as a potential risk factor for systemic diseases. **Journal of Periodontology**, v. 69, p. 841-50, 1998.

SCARPARO, R. K. et al. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: An experimental model in rat molars. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 8, p. 1069-73, 2011.

SCAVO, R. et al. Frequency and distribution of teeth requiring endodontic therapy in an Argentine population attending a specialty clinic in endodontics. **International Dentistry Journal**, v. 61, p. 257-60, 2011.

SCHAEFER, A. et al. Poliovirus-induced alterations in HeLa cell membrane functions. **Journal of Virology**, v. 44, p. 445-449, 1982.

SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. et al. UV induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. **Biological Chemistry**, v. 378, p. 1247-1257, 1997.

SCHEINER-BOBIS, G. The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport. **European Journal of Biochemical**, v. 269, p. 2424-33, 2002.

SCHNEEBERGER, A.; APELL, H.J. Ion selectivity of the cytoplasmic binding sites of the Na,K-ATPase: I. Sodium binding is associated with a conformational rearrangement. **The Journal of Membrane Biology**, v. 168, p. 221-228, 1999.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, p. 308-313, 2004.

SCHWINGER, R.H.G. et al. The Na, K-ATPase in the failing human heart. **Cardiovascular Research**, v. 57, p. 913-920, 2003.

SEGURA-EGEA, J J. Relationship between periodontal and endodontic diseases and systemic health: correlation does not imply causation. **Journal of Oral Research**, v. 7, p. 86-87, 2018.

SEGURA-EGEA, J.J. et al. Association between diabetes and the prevalence of radiolucent periapical lesions in root-filled teeth: systematic review and meta-analysis. **Clinical Oral Investigation**, v. 20, p. 1133-41, 2016.

SEGURA-EGEA, J.J.; MARTÍN-GONZÁLEZ, J.; CASTELLANOS-COSANO, L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. **International Endodontic Journal**, v. 48, p. 933-51, 2015.

SEGURA-EGEA, J.J. et al. High prevalence of apical periodontitis amongst smokers in a sample of Spanish adults. **International Endodontic Journal**, v. 41, p. 310-6, 2008.

SEGURA-EGEA, J.J. et al. High prevalence of apical periodontitis amongst type 2 diabetic patients. **International Endodontics Journal**, v. 38, p. 564-9, 2005.

SEHIRLI, A.Ö. et al. OP-022 alterations in cardiac Caveolin-3 expression and Na/K ATPase activity in rats with myocardial infarction are reversed by resveratrol. **American Journal of Cardiology**, v. 115, p. S8, 2015.

SEYMOUR, G.J. et al. Relationship between periodontal infections and systemic disease. **Clinical Microbiology Infection**, v. 13, p. 3-10, 2007.

SHAO, D. et al. Redox modification of cell signaling in the cardiovascular system. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, p. 550-558, 2011.

SHETTY, P.; KUMARI, S. Serum total anti-oxidants, superoxide dismutase (SOD), myeloperoxidase and vitamin C levels in periapical inflammation. A original study. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 3, p. 934-939, 2012.

SHETTI, A.; KELUSKAR, V.; AGGARWAL, A. Antioxidants: Enhancing oral and general health. **Journal of Indian Academy Dental Specialist Researchers**, v. 21, p. 1-5, 2009.

SIDARAVICIUS, B.; ALEKSEJUNIENE, J.; ERIKSEN, H.M. Endodontic treatment and prevalence of apical periodontitis in an adult population of Vilnius. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 15, p. 210-5, 1999.

SINDET-PEDERSEN, S.; PETERSEN, J.K.; GÖTZSCHE, P.C. Incidence of pain conditions in dental practice in a Danish county. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 13, p. 244-6, 1985.

SIVANANDHAM, V. Free radicals in health and diseases. **Pharmacology online**, v. 1, p. 1062-77, 2011.

SKOU, J.C. The identification of the sodium-pump as the membrane-bound Na⁺/K⁺-ATPase: a commentary on 'The Influence of Some Cations on an Adenosine Triphosphatase from Peripheral Nerves'. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1000, p. 435-438, 1989.

SKOU, J.C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 23, p. 394-401, 1957.

- SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE A.D. Periodontal microbial ecology. **Periodontology** 2000, v. 38, p. 135-187, 2005.
- SOUTHORN, P.A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 63, p. 390-408, 1988.
- SPITELLER, G. Is lipid peroxidation of polyunsaturated acids the only source of free radicals that induce aging and age-related diseases? **Rejuvenation Research**, v. 13, p. 91-103, 2010.
- STAHL, W.L.; HARRIS, W.E. Na⁺,K⁺-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. **Advances in Neurology**, v. 44, p. 681-693, 1986.
- STEEVES, C.H. et al. Oxidative stress response in the opportunistic oral pathogen *Fusobacterium nucleatum*. **Proteomics**, v. 11, p. 2027-37, 2011.
- SUN, Y. Free radical antioxidant enzymes and carcinogenesis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 8, p. 583-599, 1990.
- SUIÇA. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Relatório mundial de envelhecimento e saúde**. Genebra, Suíça, 2015.
- SUTHERLAND, S.E.; MATTHEWS, D.C. Conducting systematic reviews and creating clinical practice guidelines in dentistry: lessons learned. **Journal of the American Dental Association**, v. 135, p. 747-53, 2004.
- SWEADNER, K.J.; DONNERT, C. Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. **Biochemical Journal**, v. 356, p. 582-589, 2001.
- SWEADNER, K.J; GILKESON, R.C. Two isozymes of the (Na⁺,K⁺)ATPase have distinct antigenic determinants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, p. 9016-9022, 1985.
- SWEENEY, G.; KLIP, A. Mechanisms and consequences of Na⁺,K⁺-pump regulation by insulin and leptin. **Cellular and Molecular Biology**, v. 47, p. 363-372, 2001.
- SWEENEY, G.; KLIP, A. Regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase by insulin: why and how? **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 182, p. 121-133, 1998.
- TEIXEIRA, A.M. et al. Could dietary trans fatty acids induced movements disorders? Effects of exercise and its influence on Na⁺K⁺-ATPase and catalase activity in rat striatum. **Behavioural Brain Research**, v. 226, p. 504-510, 2012.
- TEIXEIRA, A.M. et al. Exercise affects memory acquisition, anxiety-like symptoms and activity of membrane-bound enzyme in brain of rats fed with different dietary fats: impairments of *trans* fat. **Neuroscience**, v.195, p. 80-88, 2011.
- THERIEN, A.G. et al. Tissue-specific distribution and modulatory role of the γ subunit of the Na,K-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 32628-32634, 1997.
- TIBÚRCIO-MACHADO, C.S. **Prevalência da periodontite apical em diferentes populações**. Tese de doutorado, UFSM, 2019.

TORABINEJAD, M. Mediators of acute and chronic periradicular lesions. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, v. 78, p. 511-21, 1994.

VAANANEN, H.K.; PARVINEN, E.K. High active isoenzyme of carbonic anhydrase in rat calvaria osteoclasts. **Histochemistry**, v. 78, p. 481-485, 1983.

VAGUE, P. et al. C-peptide, Na^+, K^+ -ATPase, and diabetes. **Experimental Diabetes Research**, v. 5, p. 37-50, 2004.

VANI, M.G. et al. Antcin C from *Antrodia cinnamomea* Protects Liver Cells Against Free Radical-Induced Oxidative Stress and Apoptosis *In Vitro* and *In Vivo* through Nrf2-Dependent Mechanism. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, 296082, 2013.

VENUGOPAL, J. et al. Ouabain promotes partial epithelial to mesenchymal transition (EMT) changes in human autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) cells. **Experimental Cell Research**, v. 355, p. 142-152, 2017.

VERNAL, R. et al. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. **Oral Diseases**, v. 12, p. 283-289, 2006.

WAGNER, C. et al. Effectiveness of the proton pump inhibitor omeprazole associated with calcium hydroxide as intracanal medication: an in vitro study. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 9, p. 1253-7, 2011.

WANG, X.; HORISBERGER, J. D. A conformation of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pump is permeable to proton. **American Journal of Physiology**, v. 268, p. C590-C595, 1995.

WEIGER, R. et al. Periapical status, quality of root canal fillings and estimated endodontic treatment needs in an urban German population. **Endodontics and Dental Traumatology**, v. 13, p. 69-74, 1997.

WOLLE, C.F.B. et al. Effects of the antioxidant agent tempol on periapical lesions in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 2, p. 191-5, 2012.

WOLLE, C.F.B. et al. Outcome of periapical lesions in a rat model of type 2 diabetes: refractoriness to systemic antioxidant therapy. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 5, p. 643-7, 2013.

XIONG, H.; WEI, L.; PENG, B. Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 35, n.2, p. 216-20, 2009.

XU, K.Y. Activation of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 1669-1677, 2005.

YAN, L. Y.; TRABER, M. G.; PACKER, L. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxydatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. **Analytical Biochemistry**, v. 228, p. 349-51, 1995.

- YAN, X. et al. Activation of Na⁺-K⁺-ATPase with DRm217 attenuates oxidative stress-induced myocardial cell injury via closing Na⁺-K⁺-ATPase/Src/ROS amplifier. **Apoptosis**, v. 22, p. 531-543, 2017.
- YAN, Y.; SHAPIRO, J.I. The physiological and clinical importance of sodium potassium ATPase in cardiovascular diseases. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 27, p. 43-49, 2016.
- YEUNG, S.Y. et al. Antioxidant and pro-oxidant properties of chlorhexidine and its interaction with calcium hydroxide solutions. **International Endodontic Journal**, v. 40, p. 837-44, 2007.
- YOON, S.O. et al. Sustained production of H₂O₂ activates pro-matrix metalloproteinase-2 through receptor tyrosine kinases/phosphatidylinositol 3-kinase/NF-kappa B pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 30271-30282, 2002.
- YOUSEF, M. I. et al. Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radicals, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats. **Toxicology**, v. 175, p. 223-234, 2002.
- YU, S.P. Na⁽⁺⁾, K⁽⁺⁾-ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1601-1609, 2003.
- YU, T-W., ANDERSON, D. Reactive oxygen species - induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, v. 379, p. 201-210, 1997.
- ZARAGOZA, C. et al. Cbfa-1 mediates nitric oxide regulation of MMP-13 in osteoblasts. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 1896-1902, 2006.
- ZHENG, J. et al. Cardioprotection induced by Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase activation involves extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. **Cardiovascular Research**, v.89, p. 51-59, 2011.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFSM)



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do estresse oxidativo sistêmicos em ratos com lesão periapical induzida", protocolada sob o CEUA nº 7021190117, sob a responsabilidade de **Carlos Alexandre Souza Bier** e equipe; *Camilla dos Santos Tibúrcio Machado; Raquel Cristine Silva Barcelos; Cristiane Cadernatori Danesi; João Carlos Giordani; Marilise Escobar Bürger* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 10/04/2017.

We certify that the proposal "Systemic Oxidative Stress evaluation in rats with induced periapical lesion", utilizing 45 Heterogenics rats (45 males), protocol number CEUA 7021190117, under the responsibility of **Carlos Alexandre Souza Bier** and team; *Camilla dos Santos Tibúrcio Machado; Raquel Cristine Silva Barcelos; Cristiane Cadernatori Danesi; João Carlos Giordani; Marilise Escobar Bürger* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 04/10/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **04/2017 a 05/2017** Área: **Fisiologia**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **50 a 65 dias**

N: **45**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **200 a 300 g**

Resumo: O estresse oxidativo é um fator resultante de um desequilíbrio de pró-oxidantes e antioxidantes que conduz a danos celulares e injúrias ao tecido. Processos inflamatórios aumentam os níveis de estresse oxidativo através da geração de radicais livres. Estudos têm levantado a hipótese de que o processo inflamatório crônico na região do periápice gerado pela necrose do tecido pulpar pode ser uma origem de desequilíbrio oxidativo sistêmico. Diante disso, o objetivo deste estudo é avaliar se a presença de uma lesão periapical crônica (LP) induzida em ratos aumenta os níveis de estresse oxidativo sistêmico. Serão utilizados 45 ratos machos Wistar com dois meses de idade. Os animais serão divididos em 6 grupos, conforme o período de desenvolvimento da lesão periapical: i) grupo controle 10 dias (n=5); ii) grupo controle 20 dias (n=5); iii) grupo controle 30 dias (n=5); iv) grupo LP 10 dias (n=10); v) grupo LP 20 dias (n=10); vi) grupo LP 30 dias (n=10). No primeiro dia do período experimental, os animais dos grupos iv, v e vi serão submetidos à abertura coronária do primeiro molar inferior direito a fim de permitir o desenvolvimento da LP. Nos demais grupos, nenhum procedimento será realizado, pois servirão como controles. A eutanásia ocorrerá aos 10, 20 e 30 dias após a abertura do molar, conforme indicação dos grupos. Serão coletados fígado, coração e plasma sanguíneo para analisar os níveis de marcadores de estresse oxidativo (catalase, glutatona reduzida e vitamina C) e hemandíbula direita para análise radiográfica e do infiltrado inflamatório da LP. Os testes estatísticos aplicados serão ANOVA de uma via ou Kruskal-Wallis para comparar os níveis de estresse oxidativo entre os seis grupos, a severidade do infiltrado inflamatório entre os grupos iv, v e vi, bem como o tamanho da LP entre esses grupos. Também serão executadas análises de correlação para testar se existe correlação entre as variáveis: grau de infiltrado inflamatório vs estresse oxidativo (Correlação de Spearman), grau de infiltrado inflamatório vs área da LP (Correlação de Spearman) e área da LP vs níveis de estresse oxidativo (Correlação de Pearson). O nível de significância estatística (?) será estabelecido em 5% ($P < 0,05$).

Local do experimento: Os procedimentos serão realizados nas instalações do LapBio.

Santa Maria, 11 de abril de 2017

Avenida Roraima, 1000, Reitoria, 2º andar - CEP 97105-900 Santa Maria, RS - tel: 55 (55) 3220-9362 / fax:
Horário de atendimento: das 8:30 às 12h e 14h às 17hs - e-mail: ceua.ufsm@gmail.com
CEUA N 7021190117



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

Daniela Bitencourt Rosa Leal

Prof. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Denis Broock Roseberg

Prof. Dr. Denis Broock Roseberg
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria