

**AVALIAÇÃO OXIDATIVA E COGNITIVA DE RATOS *WISTAR* SUBMETIDOS A  
MODELO DE LESÃO PERIAPICAL: INFECÇÃO POR *Enterococcus faecalis***

OXIDATIVE AND COGNITIVE EVALUATION OF *WISTAR* RATS SUBMITTED TO A  
PERIAPICAL LESION MODEL: *Enterococcus faecalis* INFECTION

Daniel Paulo Bortoluzzi<sup>1</sup>; Soraia Netto, Ms<sup>1</sup>; Karina Marcon Mezzari, Ms<sup>1</sup>; Diogo

Dominguini, Ph.D.<sup>1</sup>; Tatiana Barichello, Ph.D.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina (UNESC), Criciúma, 88806-000, SC, Brazil.

<sup>2</sup>Programa de Psiquiatria Translacional, Departamento de Psiquiatria e Ciências do Comportamento, McGovern Medical School, Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Texas em Houston, Houston, TX, 77054, EUA.

Autor correspondente: Daniel Paulo Bortoluzzi.

Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 88806-000, SC, Brasil. Fax: nº 55 48 3431 2736. E-mail: [danielbortoluzzi@unesc.net](mailto:danielbortoluzzi@unesc.net) ou [daniel\\_bortoluzzi@hotmail.com](mailto:daniel_bortoluzzi@hotmail.com)

## RESUMO

O processo infeccioso induzido por bactérias cariogênicas como *Enterococcus faecalis* nas lesões periapicais pode tornar-se sistêmico e interferir em múltiplos órgãos, podendo estar relacionado ao dano cognitivo. O objetivo deste estudo foi avaliar se a lesão periapical induzida em associação com *E. faecalis* apresenta potencial para o desenvolvimento do dano oxidativo em múltiplos órgãos e alterações cognitivas em modelo animal. Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos. Os animais foram divididos em quatro grupos: controle/salina, controle/*E. faecalis*, lesão/salina e lesão/*E. faecalis*. Os grupos lesão foram submetidos a perfuração endodôntica na superfície oclusal dos primeiros molares inferiores direitos. No grupo com *E. faecalis*, foram administrados via intracanal a bactéria, e a cavidade foi selada com cimento. Após 21 dias, os animais foram submetidos aos testes de campo aberto, reconhecimento de objeto e esQUIVA inibitória. Em seguida, foram eutanasiados, e as estruturas hipocampo, córtex frontal, timo, baço, coração, soro e líquido, foram utilizadas para avaliação de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF-DA), ácido tiobarbitúrico (TBA), grupamentos carbonil, catalase (CAT) e superóxido desmutase (SOD). Como resultado, observou-se prejuízo cognitivo no grupo lesão/*E. faecalis* nos testes de campo aberto, e nos grupos lesão periapical/salina e lesão periapical/*E. faecalis* no teste de reconhecimento de objetos e esQUIVA inibitória, quando comparados à sessão de treinamento. Foi observado aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e dano proteico no líquido, córtex frontal, soro, timo, baço e coração nos grupos lesão/salina e lesão/*E. faecalis*, quando comparados ao controle/salina. Ressalta-se que o grupo lesão/*E. faecalis* nas estruturas líquido, hipocampo, baço e coração, teve maior produção de espécies reativas de oxigênio comparado com o grupo lesão/salina. Também observou um aumento da atividade da CAT no hipocampo, córtex frontal, soro, timo, baço e coração e da SOD no córtex frontal e no coração no grupo lesão/*E. faecalis* quando comparado a lesão/salina. Conclui-se que a associação entre lesão periapical e *E. faecalis* pode estar relacionada ao desenvolvimento do processo inflamatório desencadeado pelo dano oxidativo, potencializando o dano cognitivo. Esta descoberta abre novas oportunidades de pesquisa em relação a este mecanismo, prevenindo assim o dano.

**Palavras-chave:** Lesão Periapical; Dano Oxidativo; Dano Cognitivo

## ABSTRACT

The infectious process induced by cariogenic bacteria such as *Enterococcus faecalis* in periapical lesions can become systemic and interfere with multiple organs, which may be related to cognitive damage. The objective of this study was to evaluate whether the periapical lesion caused in association with *E. faecalis* has the potential for the development of oxidative damage in multiple organs and cognitive changes in an animal model. Adult male Wistar rats were used. The animals were divided into four groups: control/saline, control/*E. faecalis*, lesion/saline and lesion/*E. faecalis*. The submitted groups underwent endodontic drilling on the occlusal surface of the right lower first molars. In the group with *E. faecalis*, bacteria were administered intracanal, and the cavity was sealed with cement. After 21 days, the animals were subjected to the open field, object recognition, and inhibitory avoidance tests. They were then euthanized, and the hippocampus, frontal cortex, thymus, spleen, heart, serum, and CSF structures were used to evaluate 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA), thiobarbituric acid (TBA), carbonyl groups, catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). As a result, cognitive impairment was impaired in the injured/*E. faecalis* group in the open field tests and the periapical lesion/saline and periapical lesion/*E. faecalis* in the object recognition and inhibitory avoidance test when compared to the training session. An increase in the production of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and protein damage was observed in the cerebrospinal fluid, frontal cortex, serum, thymus, spleen and heart in the injured/saline and injury/*E. faecalis* groups, when compared to control/saline. It is noteworthy that the injured group/*E. faecalis* in liquid structures, hippocampus, spleen, and heart, had greater reactive oxygen species production than the injury/saline group. It also detected increased CAT activity in the hippocampus, frontal cortex, serum, thymus, spleen, and heart and SOD in the frontal cortex and heart in the lesion/*E. faecalis* group when compared to lesion/saline. It is concluded that the association between periapical lesions and *E. faecalis* may be related to the development of the inflammatory process triggered by oxidative damage, enhancing cognitive damage. This discovery opens up new research opportunities regarding this mechanism, thus preventing damage.

**Keywords:** Periapical Lesion; Oxidative Damage; Cognitive Damage

## 1 Introdução

A periodontite periapical é uma doença inflamatória crônica, causada por infecção endodôntica, e seu desenvolvimento é regulado pela resposta imune/inflamatória do hospedeiro [1]. Aproximadamente 34% destas lesões estão associadas a cáries profundas, indicando uma relação existente entre bactérias, cárie dental e lesões periapicais [2]. Na ocorrência de uma cavidade de cárie profunda, as bactérias presentes na cavidade oral, contaminam a polpa dental levando a necrose pulpar. Neste contexto, as lesões periapicais resultam do encontro entre as bactérias presentes no sistema de canais radiculares e as células imunes do hospedeiro sendo uma dessas bactérias o *Enterococcus faecalis* [3].

O *E. faecalis*, uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, cocos catalase-negativo, comumente encontrada na água, no solo, nos alimentos e no trato gastrointestinal humano sendo o principal agente de infecções associadas aos cuidados de saúde, incluindo infecções de feridas, infecção do trato urinário, enterite hemorrágica e intoxicação alimentar [4]. É também um patógeno oportunista prolífico, que causa infecções associadas ao biofilme, como nos canais radiculares infectados tratados e não tratados, na endocardite bacteriana e infecções de próteses articulares e é frequentemente isolado de locais de infecção polimicrobiana, como são as do trato urinário, queimaduras e úlceras do pé diabético [5].

Na odontologia, *E. faecalis* é comumente isolado de canais radiculares infectados e é considerado um dos agentes etiológicos associados ao insucesso dos tratamentos endodônticos [6]. Ressalta-se que esta bactéria é frequentemente encontrada em tratamentos endodônticos malsucedidos com sua capacidade de

sobreviver em um ambiente carente de nutrientes e no ambiente dentário altamente alcalino após o tratamento com medicamentos intracanaís [7].

Quando *E. faecalis* infecta o tecido pulpar ou qualquer outro tecido, libera componentes bacterianos, como lipopolissacarídeos (LPS), toxinas e outros produtos microbianos. Esses componentes podem ativar as células do sistema imunológico, como os macrófagos, que são capazes de reconhecer os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes na superfície das bactérias [8].

As infecções e inflamações em regiões periféricas do corpo, podem agravar a inflamação no cérebro e desempenhar um papel importante na patogênese da doença de alzheimer (DA) [9]. Doenças como diabetes mellitus, hipertensão, hiperlipidemia, doença renal crônica, acidente vascular cerebral, lesão cerebral traumática, infecções no trato gastrointestinal e doenças crônicas bucais, estão associados ao aumento dos níveis séricos de proteína C reativa (PCR) e citocinas pró-inflamatórias, bem como na diminuição dos marcadores anti-inflamatórios como as interleucinas (ILs) [9]. Esta associação se deve ao aumento da inflamação sistêmica que acompanha o crescimento de microrganismos patogênicos bucais, desta forma infecções crônicas bucais, como a periodontite apical, tem capacidade de aumentar o quadro geral da inflamação sistêmica e podem desta forma, modificar o processo neuroinflamatório e causar ou exacerbar danos cognitivos [10].

O SNC é particularmente vulnerável a danos, mediados pela ativação da micróglia, em resposta à inflamação sistêmica. A micróglia reativa pode causar disfunção e danos neuronais através da liberação de citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio. O ambiente pró-inflamatório está relacionado a processo de aprendizado e memória prejudicado no SNC, contribuindo para a

disfunção cognitiva transitória e mais duradoura [11]. A micróglia é a maior das populações de macrófagos residentes no SNC e representa 5 a 10% das células do cérebro. Quando ativadas liberam citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , levando a neuroinflamação (Figura 1). Estas citocinas podem afetar diretamente os neurônios ou indiretamente regulando a expressão de muitos outros genes [12].

Acredita-se que na lesão apical, a neuroinflamação e o dano oxidativo induzidas é contínua e de baixo grau, realizada pela secreção prolongada de citocinas pró-inflamatórias pelas células gliais que, ao longo do tempo, contribuem para a morte celular neuronal. Quando o estímulo inflamatório sistêmico não é resolvido a tempo, ele leva a um estado em que a microglia constantemente ativada se torna excessivamente sensível a um novo gatilho imunológico e responde de maneira exagerada [13].

O SNC é protegido pela barreira hematoencefálica (BHE), mas a exposição prolongada a espécies reativas de oxigênio (EROs) pode interromper e aumentar a permeabilidade da BHE, além de que as células leptomeníngicas, presentes na camada mais interna das meninges, podem transduzir os sinais inflamatórios periféricos dos macrófagos para a microglia, gerando a neuroinflamação, com consequências deletérias para o cérebro, podendo a longo prazo gerar o dano cognitivo [14].

A ligação entre periodontite e neuroinflamação observada em seres humanos é apoiada por estudos em animais, mas ainda está muito incerta essa relação, estudos em um modelo murino de periodontite em que uma ligadura foi colocada ao redor do segundo molar superior, foi detectado aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e EROs no tecido gengival e no cérebro, indicando que a inflamação

induzida pela periodontite pode desencadear a resposta imune no cérebro e causar neuroinflamação [10, 15]. Sabendo disso, o objetivo desse estudo é avaliar o dano oxidativo e cognitivo em ratos *Wistar* submetidos a modelo de lesão periapical induzida e em associação com a bactéria *E. faecalis*.

## **2 Materiais e Métodos**

### **2.1 Animais**

Ratos *Wistar* machos (60 dias de idade, peso entre 200 e 300 g) provenientes da colônia de reprodução da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Os animais foram alojados em grupos de cinco com água e ração disponíveis *ad libitum* e mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7h00), a uma temperatura de 23 °C ± 1 °C. Estas condições foram mantidas constantes ao longo dos experimentos. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Experimentação e Cuidado Animal da UNESC (Protocol 37/2022).

### **2.2 Procedimento Experimental**

Ao completar 60 dias de vida, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (controle/salina, controle/*E. faecalis*, lesão periapical/salina e lesão periapical/*E. faecalis*) sendo um n=20 animais por grupo. Os grupos lesão periapical/salina e lesão periapical/*E. faecalis* foram submetidos cirurgia de indução de lesão periapical onde o grupo lesão periapical/*E. faecalis* foi contaminado com 10

$\mu\text{L}$  da bactéria *E. faecalis* e o grupo lesão periapical/salina foi contaminado com 10  $\mu\text{L}$  de solução salina. Já o controle/salina teve a cavidade oral contaminado com 10  $\mu\text{L}$  de solução salina e o grupo controle/*E. faecalis*, teve a cavidade oral contaminados com 10  $\mu\text{L}$  da bactéria *E. faecalis*. Os animais foram acompanhados durante 21 dias.

Ao completar 21 dias após a indução da lesão, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de habituação ao campo aberto, reconhecimento de objetos novos e esquia inibitória. Em seguida foram eutanasiados, e as estruturas, incluindo hipocampo, córtex frontal, timo, baço, coração, soro e líquido, foram utilizadas para avaliação de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF-DA), ácido tiobarbitúrico (TBA), grupamentos carbonil, catalase (CAT) e a atividade da superóxido desmutase (SOD). Ambos os grupos não houve taxa de mortalidade durante os 21 dias.

### **2.3 Modelo de Lesão Periapical**

Os animais pertencentes ao grupo lesão periapical foram anestesiados com cloridrato de cetamina (6,6 mg/kg) e cloridrato de xilazina (0,3 mg/kg) via intraperitoneal.

Os ratos *Wistar* foram submetidos à lesão periapical utilizando caneta de alta rotação (Turbina Extra Torque 505C - Kavo), broca esférica carbide cirúrgica de carboneto de tungstênio número ½ com haste longa (Beavers Dental-55 Laurel Dr Morrisburg, Canadá). A lesão periapical foi induzida no primeiro molar inferior do lado direito de cada animal [16, 17]. Três pesquisadores foram necessários para fazer o procedimento. O primeiro manteve a cavidade oral do animal aberta com o uso de fio dental em amarrilha, segurando nos incisivos superiores e inferiores. O segundo

estava aspirando a água da alta rotação com sugadores cirúrgicas descartáveis (Sugador Flex Suctor Cirúrgico - Angelus). O terceiro estava realizando a perfuração endodôntica na superfície oclusal do primeiro molar inferior direito, chegando ao teto da câmara pulpar e confirmado com a utilização de um instrumento endodôntico calibre 10 (lima K Flex Maillefer - Dentsply). Aproximadamente 10 µL da suspensão bacteriana de *E. faecalis* ou salina (de acordo com o grupo experimental) foi transferida para bolas de algodão estéreis e colocadas na cavidade medular exposta. A cavidade de acesso será selada com cimento de ionômero de vidro. Os animais do grupo controle/*E. faecalis* receberão 10 µL da suspensão bacteriana em *swab* [18].

A cepa de *E. faecalis*, ATCC 19433, proveniente do Fundação André Tosello, São Paulo, Brasil, será cultivada em 5 mL de caldo Todd Hewitt BBL™, a 37°C até crescimento logarítmico. No dia da indução a cultura será centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm e suspendida em salina estéril até chegar a uma concentração de  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colônias por mL (UFCol/mL) [18]

Após o procedimento, a reposição volêmica com solução salina isotônica à 0,9% foram administradas por via subcutânea e foram delicadamente colocados em suas respectivas gaiolas. Todos os animais foram monitorados quanto a dor e desconforto, e assim que os mesmos apresentarem algum sinal, foi administrado dipirona sódica na dose de 7 mg/kg intramuscular.

## **2.4 TESTES COMPORTAMENTAIS**

### **2.4.1 Tarefa de campo aberto**

Esta tarefa avalia o desempenho motor na sessão de treinamento e a memória não associativa na sessão de teste de retenção. A habituação ao campo aberto foi realizada em campo aberto de 40 x 60 cm cercado por paredes de compensado marrom de 50 cm de altura com parede frontal de vidro. O piso do campo aberto foi dividido em 9 retângulos iguais por linhas pretas. Os animais foram gentilmente posicionados no quadrante traseiro esquerdo e deixados para explorar a arena por 5 minutos (sessão de treinamento). Imediatamente em seguida, os animais foram levados de volta à sua gaiola e 24 horas depois submetidos novamente a uma sessão semelhante em campo aberto (sessão teste). Foram contabilizados os cruzamentos das linhas pretas e os levantamentos realizados em ambas as sessões. A diminuição no número de cruzamentos e levantamento entre as duas sessões foi tomada como uma medida da retenção da habituação [19]

### **2.4.2 Tarefa de Reconhecimento de Objeto Novo**

Esta tarefa avalia a memória não aversiva e não espacial [20]. A tarefa ocorreu em um campo aberto de 40 x 50 cm cercado por paredes de compensado de 50 cm de altura com parede frontal de vidro. O piso do campo aberto foi dividido por linhas pretas em 9 retângulos iguais. Todos os animais foram submetidos a uma sessão de habituação onde foram autorizados a explorar livremente o campo aberto durante 5 minutos; nenhum objeto foi colocado na caixa durante o teste de

habituação. Após 24 horas, dois objetos idênticos (objetos A1 e A2, ambos cubos) foram posicionados em dois cantos adjacentes, a 10 cm das paredes. No teste de memória de reconhecimento de longo prazo aplicado 24 horas após o treinamento, os ratos exploraram o campo aberto por 5 minutos na presença de um objeto familiar (A1) e um objeto novo (B). Todos os objetos tinham textura, cor e formas distintas. Um índice de reconhecimento foi calculado para cada animal e relatado como a razão  $TB / (TA + TB)$  (TA = tempo gasto explorando o objeto familiar A; TB = tempo gasto explorando o novo objeto B).

### **2.4.3 Tarefa de Esquiva Inibitória**

O teste de esquiva inibitória foi realizado em um aparato que consiste em uma caixa de acrílico medindo 50 x 25 x 25 cm (Albarsch, Porto Alegre, Brasil), cujo piso é formado por barras paralelas de aço inoxidável (diâmetro de 1 mm) espaçadas em uma distância de 1 cm. Uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento foi colocada junto à parede esquerda do aparelho. Na sessão treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e o tempo que estes levaram para descer sobre as grades com as quatro patas foi contabilizado. Imediatamente após tocarem com as quatro patas na grade, os animais receberam um choque de 0,4 mA durante 2 segundos e voltaram à sua gaiola de origem. A sessão teste foi realizada 24 horas após a sessão treino. Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e foi medido o tempo que ele levou para descer (latência), porém não foi aplicado o choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória [21, 22]. O teste de esquiva inibitória avalia a memória aversiva do animal [23, 24].

## **2.5 Dissecção de estruturas**

Imediatamente após os testes comportamentais, os ratos foram eutanasiados por decapitação e as estruturas do hipocampo, córtex frontal, timo, baço, coração, soro e líquido foram coletados. Imediatamente após a coleta, do hipocampo, córtex frontal, timo, baço e coração foram transferidos por 1 min para tampão de isolamento gelado (manitol 0,23 M, sacarose 0,07 M, Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM, pH 7,4). Logo após, as estruturas foram rapidamente congeladas e armazenadas a 80 °C.

## **2.6 Níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

O dano oxidativo nos lipídios foi avaliado pela formação de TBARS durante uma reação de aquecimento ácido, conforme descrito anteriormente por Draper e Hadley et al., (1990) [25]. As amostras foram misturadas com 1 ml de ácido tricloroacético 10% e 1 ml de ácido tiobarbitúrico 0,67% e depois aquecidas por 30 min. Os níveis de TBARS foram determinados espectrofotometricamente pela absorvância a 532 nm.

## **2.7 Medida do dano oxidativo em proteínas do grupo carbonil**

O dano oxidativo em proteínas foi medido através da determinação do conteúdo de grupos carbonila com base na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH), conforme descrito anteriormente por Levine et al (1990) [26]. As proteínas foram precipitadas pela adição de ácido tricloroacético a 20% e foram redissolvidas em DNPH. A absorvância foi monitorizada espectrofotometricamente a 370 nm.

## **2.9 Níveis de espécie reativa de oxigênio**

A produção de ERO foi detectada usando o composto de permeação de células não fluorescentes, diacetato de 2'7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA). O DCFH-DA foi hidrolisado pelas esterases intracelulares em diclorofluorescina (DCFH). Essa molécula não fluorescente é então oxidada a diclorofluorescina fluorescente (DCF) pela ação de oxidantes celulares. As amostras de estrutura foram tratadas com DCFH-DA (10  $\mu$ M) por 30 minutos, a 37 °C. Após a exposição ao DCFH-DA, as amostras foram lavadas com solução de PBS com Triton X-100 0,2%. A fluorescência foi medida em um leitor de placas (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, EUA) com excitação a 485 nm e emissão a 520 nm e os valores foram expressos como unidades de fluorescência/ $\mu$ g proteína [27].

## **2.10 Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi determinada medindo a taxa de decaimento da absorvância do peróxido de hidrogênio em 240 nm conforme previamente descrito [28, 29]. A atividade da SOD foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente conforme previamente descrito [30].

## **2.11 Medidas de proteína**

As medições de proteína total foram determinadas pelo Lowry et al.(1951) e albumina sérica bovina foi usada como padrão [31]. Primeiramente, para a realização da curva padrão de albumina bovina (BSA), logo após a realização da

técnica foram utilizados 10 µL do tecido homogeneizado, misturados com 190 µL de água destilada.

Foi preparado o reativo C que consiste no reativo A (NaOH 0,1N - 4g + 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - 20g; diluído em 1000ml de água destilada) + reativo B (sulfato cúprico (1% em água destilada) e tartarato de sódio/potássio (2% em água destilada)) (Sigma-Aldrich). 1000µL de C reativo foi adicionado a cada amostra e à curva e aguardou 10 minutos. Em seguida, adicionou-se Folin 1N (Sigma-Aldrich), agitou-se e esperou-se 30 minutos para que a reação ocorresse. Logo após as leituras foram realizadas em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 700nm (SpectraMax Plus 384) [32].

## 2.11 Análise Estatística

Os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e para homogeneidade usando o teste de Levene. Os dados normais e homogêneos, foram utilizados testes paramétricos como o teste T de Student para comparar o treino e teste, e o teste de anova de duas vias seguido do *Post Hoc* de Turkey, para comparação entre grupos e dados foram apresentados como média ± EPM; e os dados que não cumpriram estas condições, foram utilizados os testes não-paramétricos com a utilização de Wilcoxon para amostras pareadas e os dados expressos em mediana e intervalo interquartil. Para todas as análises, foram adotado um nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

### 3 Resultado

Ao completar 21 dias, foi determinado o efeito do *E. faecalis* na disfunção cognitiva de longo prazo induzida pela lesão periapical (Figura 1). Observou-se prejuízo cognitivo no grupo lesão periapical/*E. faecalis* na tarefa de campo aberto, comparando a sessão de treino com a sessão de teste. Por outro lado, nos grupos controle/salina, controle/*E. faecalis* e lesão periapical/salina apresentam uma conservação na memória de habituação (Figura 1a). Já na tarefa de reconhecimento de objetos (Figura 1b), os animais dos grupos lesão periapical/*E. faecalis* e lesão periapical/salina apresentaram memória de reconhecimento de novos objetos prejudicada. No entanto, nos grupos controle/salina e controle/*E. faecalis*, houve diferença entre as sessões de treinamento e teste, demonstrando que não houve prejuízo na memória de longo prazo para o reconhecimento de novos objetos ( $p < 0,05$ ). No teste de esQUIVA inibitória (Figura 1c), observou-se o mesmo padrão, caracterizando assim, o dano cognitivo no grupo lesão periapical/*E. faecalis*.

Os níveis de espécies reativas de oxigênio, após 21 dias da indução da lesão periapical, estiveram significativamente aumentados ( $p < 0,05$ ) no grupo lesão periapical/salina e no grupo lesão periapical/*E. faecalis*, em comparação com o grupo controle/salina, em todas as estruturas estudadas ( $p < 0,05$ ). Além disso, no grupo lesão periapical/*E. faecalis*, em comparação com o grupo lesão periapical/salina, também foi observado esse aumento em áreas como líQUOR, hipocampo, baço e coração (Figura 2a). Além disso, houve um aumento do dano lipídico (Figura 2b) e proteico (Figura 2c) em todas as estruturas investigadas nos grupos lesão periapical/salina e lesão periapical/*E. faecalis*, quando comparados ao grupo controle/salina ( $p < 0,05$ ).

Ao avaliar a defesa enzimática antioxidante, a atividade da CAT (Figura 3a) estava aumentada ( $p < 0,05$ ) no grupo lesão periapical/*E. faecalis*, em comparação com o grupo controle/salina, em áreas como hipocampo, córtex frontal, soro, timo, baço e coração. Esse aumento também foi observado no grupo lesão periapical/salina, em comparação com o grupo controle/salina, nas áreas do timo e coração. Interessantemente, nas áreas do soro e baço, a atividade da CAT estava aumentada no grupo lesão periapical/*E. faecalis*, em comparação com o grupo lesão periapical/salina. Na atividade de superóxido dismutase (Figura 3b), observou-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no grupo lesão periapical/*E. faecalis*, em comparação com o grupo controle/salina, no córtex frontal e coração, e um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no grupo lesão periapical/*E. faecalis*, em comparação com o grupo lesão periapical/salina, no baço e coração.

#### **4 Discussão**

No presente estudo avaliou-se a influência *E. faecalis*, na lesão periapical em modelo experimental utilizando Ratos wistar. A lesão periapical é a inflamação dos tecidos de suporte dos dentes que, em casos graves, leva à perda do elemento dental e complicações sistêmicas [33]. Acredita-se que saúde periodontal é um importante determinante de saúde ligado a diversas condições sistêmicas como por exemplo, as doenças cardiovasculares [34, 35]. A evidência disponível sobre a saúde periodontal e a deterioração cognitiva é insuficiente e sujeita a limitações, no entanto o presente estudo demonstrou que o comprometimento cognitivo nos animais com lesão no elemento dental sendo exacerbada quando associada a contaminação pela bactéria *E. faecalis* [33, 36]. Verificou-se também que tanto os animais submetidos à

lesão periapical/salina quanto os animais submetidos à lesão periapical/ *E. faecalis* apresentaram comprometimento da memória 21 dias após a lesão sem contaminação e lesão contaminada com *E. faecalis*.

Esses resultados sugerem que a lesão periapical, mesmo na ausência de *E. faecalis*, pode afetar negativamente a função cognitiva, e a presença dessa bactéria parece exacerbar ainda mais esse comprometimento, ainda mais se estiver associado a bactérias com alto potencial patogênico [37, 38]. A perda dentária também pode prejudicar independentemente a cognição, reduzindo a estimulação sensório-motora do aparelho mastigatório, que tem sido associada a alterações cerebrais atroficas [39]. Essa associação pode depender de fatores como magnitude/dose e duração da exposição [37, 40].

De fato, estudos anteriores de nosso laboratório demonstraram que após três semanas da lesão periapical há o desenvolvimento do comprometimento da memória (Barichello, 2015). Acredita-se que o dano cognitivo desenvolveu visto o processo inflamatório resultante da contaminação e resposta sistêmica mediada por citocinas pró-inflamatórias e pelo dano oxidativo. Sabe-se que a inflamação e a contaminação bactéria, pode resultar na amplificação da resposta inflamatória afetando múltiplos órgãos, incluindo o SNC [41]. Na sepse, o estresse oxidativo está diretamente correlacionado com o comprometimento cognitivo em um modelo animal e em estruturas [42].

No SNC, principalmente nas estruturas do hipocampo e córtex pré-frontal, a inflamação pode induzir apoptose neuronal através da ativação da microglia, onde são células imunes residentes do sistema nervoso central, que leva a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Estudo relata que um nível aumentado de estresse oxidativo celular, foi relatado que as células neuronais podem morrer por apoptose

desencadeando o dano cognitivo [43]. Outro estudo relata que o estresse oxidativo é acompanhado de disfunção mitocondrial, inflamação pronunciada, gliose, degeneração axonal e comprometimento da transmissão sináptica que, em última análise, termina em perda neuronal progressiva, predominantemente por apoptose [44].

De fato, na lesão periapical, o estresse oxidativo é um dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes [45]. Nosso estudo revelou que a lesão periapical pode ser provocada pelo aumento do EROs que por sua vez pode ocasionar o desequilíbrio entre a produção excessiva e uma deficiência relativa de componentes antioxidantes, ocasionando lesões na membrana celular, proteínas, organelas e até mesmo no DNA celular [40, 46]. O desenvolvimento do aumento do dano lipídico já foi relatado por Miricescu et al., 2014, em indivíduos com lesão periapical em tecido bucal e em saliva. Nesse mesmo estudo, foram relatados danos oxidativos ao DNA de células bucais, corroborando com o presente estudo [47].

Notavelmente, estudos demonstram o aumento do nível de MDA e do dano proteico acentuadamente tanto na saliva quanto no tecido local, no entanto não há evidências da persistência desse dano em tecidos como o timo e o baço. No entanto no sistema cardíaco, pode induzir ao infarto do miocárdio, isquemia/reperfusão e insuficiência cardíaca [48]. Segundo estudo publicado de Aimó 2020, o estresse oxidativo também pode induzir a apoptose de cardiomiócitos, contribuindo ainda mais para a transição da hipertrofia cardíaca para disfunção contrátil e insuficiência cardíaca. A apoptose é ativada por uma via extrínseca, estimulada por ligantes da superfamília de receptores de morte, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), ou por uma via intrínseca, que é regulada pelas proteínas da família do linfoma de células B 2 (Bcl-2) e depende da mitocondrial [49].

Com a potencialização do dano oxidativo pela contaminação pela *E. faecalis*, pode ser que aja a indução da degeneração neuronal no SNC, no processo de envelhecimento, bem como em doenças neurodegenerativas, desencadeando a esclerose lateral amiotrófica (ELA), doença de Alzheimer (DA), doença de Parkinson, depressão maior [42, 50], além de ocasionar de causar distúrbios da parede arterial, insuficiência cardíaca e alterações na fisiologia dos miócitos, interferindo na atividade elétrica e no débito cardíaco. A *E. faecalis* pode predispor a infecção cardíaca e do saco do miocárdio (pericárdio), os principais fatores que contribuem para o desenvolvimento têm uma relação complexa entre alterações metabólicas e moleculares no estresse oxidativo, inflamação, metabolismo lipídico e disfunção endotelial e miocárdica [48].

De acordo com Barichello et al 2010, acredita-se que as defesas antioxidantes enzimáticas não são moduladas em nosso modelo, e isso poderia ser responsável, em parte, pela ocorrência de dano oxidativo no cérebro de ratos [42]. O SNC é particularmente vulnerável aos efeitos deletérios do estresse oxidativo devido ao alto conteúdo lipídico do cérebro, sendo os lipídios os alvos primários das ERO, e também devido às baixas defesas antioxidantes do SNC [42].

Além disso, alguns estudos sugerem que a diminuição das atividades de antioxidantes enzimáticos, como a SOD e CAT, estava associadas ao aumento da gravidade da lesão apical e o possível resposta inflamatória sistêmica, enquanto outros estudos afirmam que há uma elevação significativa da atividade da SOD em decorrência do aumento das EROs com a progressão da inflamação do elemento dental e o aumento da contaminação bacteriana [47, 51, 52]. Acredita-se que o aumento da atividade dessas enzimas antioxidantes tem um papel fundamental principalmente na redução do dano oxidativo reduzindo assim possíveis lesões

maiores em todos os sistemas estudados. Estudo demonstrou que o uso de antioxidantes teve a capacidade de aumentar a atividade enzimática, reduzindo ainda mais os níveis de EROs e o dano oxidativo nos tecidos de mucosa oral, cardíacos, pulmonares e cerebrais de modelos animais de inflamação associados a *E. faecalis*, apresentando assim uma alternativa para o mesmo [35, 53-61].

Em conclusão, os resultados indicam que a presença de *E. faecalis* junto com a lesão periapical está associada a um agravamento da disfunção cognitiva, aumento das EROs e danos oxidativos em várias áreas do corpo. A ativação das defesas antioxidantes também foi observada, possivelmente como uma tentativa de proteger os tecidos dos danos oxidativos. Essas descobertas podem ter implicações importantes na compreensão das consequências da lesão periapical e do papel do *E. faecalis* na saúde cognitiva e na homeostase oxidativa, podendo abrir novos espaços para pesquisa frente a esse mecanismo e desenvolvimento de tratamento amenizadores de dano.

## **Agradecimentos**

Este trabalho foi apoiado pela Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Medicina Translacional (INCT).

## **Declaração de Ética**

Todos os procedimentos experimentais foram realizados com aprovação do Comitê de Ética da Universidade do Extremo Sul Catarinense (protocolo número:37/2022) e em conformidade com as regulamentações internacionais.

## **Conflito de interesses**

Os autores declaram que não há conflito de interesses que possa ser percebido como prejudicial à imparcialidade da pesquisa relatada.

## **Fontes de financiamento**

Esta pesquisa foi apoiada pela Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Medicina Translacional (INCT).

## **Contribuições dos autores**

DPB, DD, TB, SN, KMM e JSG conceberam o estudo. DPB e DD prepararam o manuscrito. TB editou o manuscrito e supervisionou o estudo. DPB, DD, KMM e SN foram responsáveis pelos testes comportamentais e análises bioquímicas. Todos os autores aprovaram a versão final do manuscrito.

## Disponibilidade de dados e materiais

Todos os dados gerados e analisados durante este estudo estão disponíveis no autor correspondente mediante solicitação razoável.

## Consentimento para participar

Não aplicável

## Consentimento para Publicação

Não aplicável.

## Referências

1. Sasaki, H., et al., *Interrelationship Between Periapical Lesion and Systemic Metabolic Disorders*. *Curr Pharm Des*, 2016. **22**(15): p. 2204-15.
2. Lin, Y., et al., *Decreased Expression of Semaphorin3A/Neuropilin-1 Signaling Axis in Apical Periodontitis*. *Biomed Res Int*, 2017. **2017**: p. 8724503.
3. Howait, M., et al., *Elevated Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes Inflammatory Bone Resorption Induced in a Mouse Model of Periradicular Periodontitis*. *J Immunol*, 2019. **202**(7): p. 2035-2043.
4. Oh, H.K., et al., *Comparison of Enterococcus faecalis Biofilm Removal Efficiency among Bacteriophage PBEF129, Its Endolysin, and Cefotaxime*. *Viruses*, 2021. **13**(3).
5. Gholizadeh, P., et al., *Role of CRISPR-Cas system on antibiotic resistance patterns of Enterococcus faecalis*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2021. **20**(1): p. 49.
6. Kim, M.A., V. Rosa, and K.S. Min, *Characterization of Enterococcus faecalis in different culture conditions*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 21867.
7. Strateva, T., et al., *Incidence of virulence determinants in clinical Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolates collected in Bulgaria*. *Braz J Infect Dis*, 2016. **20**(2): p. 127-33.
8. Zhao, L., et al., *Effects of Enterococcus faecalis lipoteichoic acid on receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin expression in periodontal ligament fibroblasts*. *Int Endod J*, 2014. **47**(2): p. 163-72.
9. Chen, C.K., Y.T. Wu, and Y.C. Chang, *Association between chronic periodontitis and the risk of Alzheimer's disease: a retrospective, population-based, matched-cohort study*. *Alzheimers Res Ther*, 2017. **9**(1): p. 56.

10. Kantarci, A., et al., *Microglial response to experimental periodontitis in a murine model of Alzheimer's disease*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 18561.
11. Michelon, C., et al., *The Role of Secretase Pathway in Long-term Brain Inflammation and Cognitive Impairment in an Animal Model of Severe Sepsis*. Mol Neurobiol, 2020. **57**(2): p. 1159-1169.
12. Ni, J. and Z. Wu, *Inflammation Spreading: Negative Spiral Linking Systemic Inflammatory Disorders and Alzheimer's Disease*. Front Cell Neurosci, 2021. **15**: p. 638686.
13. Perry, V.H. and C. Holmes, *Microglial priming in neurodegenerative disease*. Nat Rev Neurol, 2014. **10**(4): p. 217-24.
14. Wu, J., Q. Li, and X. Fu, *Fusobacterium nucleatum Contributes to the Carcinogenesis of Colorectal Cancer by Inducing Inflammation and Suppressing Host Immunity*. Transl Oncol, 2019. **12**(6): p. 846-851.
15. Furutama, D., et al., *IL-6 Induced by Periodontal Inflammation Causes Neuroinflammation and Disrupts the Blood-Brain Barrier*. Brain Sci, 2020. **10**(10).
16. Liu, L., et al., *The expression of MCP-1 and CCR2 in induced rats periapical lesions*. Arch Oral Biol, 2014. **59**(5): p. 492-9.
17. Scarparo, R.K., et al., *Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars*. J Endod, 2011. **37**(8): p. 1069-73.
18. Chen, S., et al., *Micro-CT analysis of chronic apical periodontitis induced by several specific pathogens*. Int Endod J, 2019. **52**(7): p. 1028-1039.
19. Vianna, M.R., et al., *Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat*. Learn Mem, 2000. **7**(5): p. 333-40.
20. de Lima, M.N., et al., *Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats*. Behav Brain Res, 2005. **156**(1): p. 139-43.
21. Izquierdo, I., et al., *Mechanisms for memory types differ*. Nature, 1998. **393**(6686): p. 635-6.
22. Bevilaqua, L.R., et al., *Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task*. Eur J Neurosci, 2003. **17**(4): p. 897-902.
23. Roesler, R., et al., *Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats*. Brain Res, 2003. **975**(1-2): p. 207-13.
24. Quevedo, J., et al., *Involvement of mechanisms dependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the hippocampus but not in the caudate nucleus in memory*. Behav Pharmacol, 1997. **8**(8): p. 713-7.
25. Draper, H.H. and M. Hadley, *Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation*. Methods Enzymol, 1990. **186**: p. 421-31.
26. Levine, R.L., et al., *Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins*. Methods Enzymol, 1990. **186**: p. 464-78.
27. Kim, H. and X. Xue, *Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining*. J Vis Exp, 2020(160).
28. Bannister, J.V. and L. Calabrese, *Assays for superoxide dismutase*. Methods Biochem Anal, 1987. **32**: p. 279-312.
29. Aebi, H., *Catalase in vitro*. Methods Enzymol, 1984. **105**: p. 121-6.
30. Lissi, E., et al., *Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements*. Free Radic Biol Med, 1995. **18**(2): p. 153-8.
31. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
32. Dominguni, D., et al., *Ammonia exposition during gestation induces neonatal oxidative damage in the brain and long-term cognitive alteration in rats*. An Acad Bras Cienc, 2020. **92**(4): p. e20190925.

33. Hu, X., et al., *Periodontal disease and the risk of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis*. *Psychogeriatrics*, 2021. **21**(5): p. 813-825.
34. Qi, X., et al., *Dose-Response Meta-Analysis on Tooth Loss With the Risk of Cognitive Impairment and Dementia*. *J Am Med Dir Assoc*, 2021. **22**(10): p. 2039-2045.
35. Peng, Z., et al., *Phosphotransferase systems in Enterococcus faecalis OG1RF enhance anti-stress capacity in vitro and in vivo*. *Res Microbiol*, 2017. **168**(6): p. 558-566.
36. Guo, H., et al., *The Effect of Periodontitis on Dementia and Cognitive Impairment: A Meta-Analysis*. *Int J Environ Res Public Health*, 2021. **18**(13).
37. Chen, J., et al., *Tooth Loss Is Associated With Increased Risk of Dementia and With a Dose-Response Relationship*. *Front Aging Neurosci*, 2018. **10**: p. 415.
38. Alvarenga, M.O.P., et al., *Is There Any Association Between Neurodegenerative Diseases and Periodontitis? A Systematic Review*. *Front Aging Neurosci*, 2021. **13**: p. 651437.
39. Wang, X., J. Hu, and Q. Jiang, *Tooth Loss-Associated Mechanisms That Negatively Affect Cognitive Function: A Systematic Review of Animal Experiments Based on Occlusal Support Loss and Cognitive Impairment*. *Front Neurosci*, 2022. **16**: p. 811335.
40. Dutra, T.P., et al., *Do smokers have a different gingival crevicular fluid cytokine/chemokine profile than nonsmokers in clinically healthy periodontal sites? A systematic review and meta-analysis*. *Clin Oral Investig*, 2022. **26**(2): p. 1183-1197.
41. Thomson, W.M. and Y. Barak, *Tooth Loss and Dementia: A Critical Examination*. *J Dent Res*, 2021. **100**(3): p. 226-231.
42. Barichello, T., et al., *Antibiotic therapy prevents, in part, the oxidative stress in the rat brain after meningitis induced by Streptococcus pneumoniae*. *Neurosci Lett*, 2010. **478**(2): p. 93-6.
43. Annunziato, L., et al., *Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions*. *Toxicol Lett*, 2003. **139**(2-3): p. 125-33.
44. Jazvinščak Jembrek, M., P.R. Hof, and G. Šimić, *Ceramides in Alzheimer's Disease: Key Mediators of Neuronal Apoptosis Induced by Oxidative Stress and A $\beta$  Accumulation*. *Oxid Med Cell Longev*, 2015. **2015**: p. 346783.
45. Sun, X., et al., *Mitochondrial dysfunction is involved in the aggravation of periodontitis by diabetes*. *J Clin Periodontol*, 2017. **44**(5): p. 463-471.
46. Wang, Y., et al., *Curcumin Attenuates Periodontal Injury via Inhibiting Ferroptosis of Ligature-Induced Periodontitis in Mice*. *Int J Mol Sci*, 2023. **24**(12).
47. Miricescu, D., et al., *Salivary biomarkers: relationship between oxidative stress and alveolar bone loss in chronic periodontitis*. *Acta Odontol Scand*, 2014. **72**(1): p. 42-7.
48. Przybylska, S. and G. Tokarczyk, *Lycopene in the Prevention of Cardiovascular Diseases*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(4).
49. Aimo, A., et al., *Oxidative stress and inflammation in the evolution of heart failure: From pathophysiology to therapeutic strategies*. *Eur J Prev Cardiol*, 2020. **27**(5): p. 494-510.
50. Comim, C.M., et al., *Central Nervous System Involvement in the Animal Model of Myodystrophy*. *Molecular Neurobiology*, 2013. **48**(1): p. 71-77.
51. Trivedi, S., et al., *Association of salivary lipid peroxidation levels, antioxidant enzymes, and chronic periodontitis*. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2015. **35**(2): p. e14-9.
52. Ghallab, N.A., E. Hamdy, and O.G. Shaker, *Malondialdehyde, superoxide dismutase and melatonin levels in gingival crevicular fluid of aggressive and chronic periodontitis patients*. *Aust Dent J*, 2016. **61**(1): p. 53-61.
53. Araújo, A.A., et al., *Effects of metformin on inflammation, oxidative stress, and bone loss in a rat model of periodontitis*. *PLoS One*, 2017. **12**(8): p. e0183506.
54. Yanko, N.V., et al., *PERIODONTAL DISEASE AND SALIVARY OXIDATION STRESS IN CHILDREN WITH LYMPHOGRANULOMATOSIS*. *Wiad Lek*, 2023. **76**(7): p. 1569-1575.
55. Dai, X., et al., *Enterococcus faecalis-Induced Macrophage Necroptosis Promotes Refractory Apical Periodontitis*. *Microbiol Spectr*, 2022. **10**(4): p. e0104522.

56. Barbosa-Ribeiro, M., et al., *Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment*. Clin Oral Investig, 2021. **25**(4): p. 2017-2027.
57. Wang, J., et al., *The effects of ultraviolet disinfection on vancomycin-resistant Enterococcus faecalis*. Environ Sci Process Impacts, 2020. **22**(2): p. 418-429.
58. van der Bij, A.K., D. Frenzt, and M.J. Bonten, *Gram-positive cocci in Dutch ICUs with and without selective decontamination of the oropharyngeal and digestive tract: a retrospective database analysis*. J Antimicrob Chemother, 2016. **71**(3): p. 816-20.
59. Becerra, M.C., A.J. Eraso, and I. Albesa, *Comparison of oxidative stress induced by ciprofloxacin and pyoverdine in bacteria and in leukocytes to evaluate toxicity*. Luminescence, 2003. **18**(6): p. 334-40.
60. Tian, L., et al., *Esculin and ferric citrate-incorporated sturgeon skin gelatine as an antioxidant film for food packaging to prevent Enterococcus faecalis contamination*. Food Funct, 2020. **11**(10): p. 9129-9143.
61. Nasim, I., et al., *Antioxidant and anti-inflammatory activity of a nanoparticle based intracanal drugs*. Bioinformation, 2022. **18**(5): p. 450-454.

## Legendas de figuras

**Figura 1 - Os efeitos do *E. faecalis* no comprometimento cognitivo de longo prazo em animais.** A *E. faecalis* foi induzida através de lesão periapical. Vinte e um dias após os animais terem sido submetidos a (a) tarefa de campo aberto, (b) tarefa de reconhecimento de objeto novo e (c) tarefa de esquiva inibitória. Os dados da tarefa de campo aberto foram avaliados, o número de cruzamentos e movimentos de levantamento foram relatados como média + SEM e foram analisados por testes t de Student pareados e ANOVA post-hoc testes de Tukey (n = 10 animais por grupo). \*p < 0,05 vs. treinamento. Os dados da tarefa de reconhecimento de objetos e de esquiva inibitória foram relatados como mediana e intervalos interquartis do índice de reconhecimento de objetos na seção de treinamento e na seção de teste (intervalo de 24 horas para cada seção). As comparações entre os grupos foram realizadas por meio de testes U de Mann-Whitney. A análise intragrupo foi realizada por meio dos testes de Wilcoxon. (n = 10 animais por grupo). \*p < 0,05 vs. treinamento.

**Figura 2 – Desenvolvimento do dano oxidativo em animais submetidos a lesão periapical e a contaminação por *E. faecalis*.** A *E. faecalis* foi induzida através de lesão periapical. Vinte e um dias após os animais foram avaliados os níveis de DCF-DA (a) TBARS (b) e proteínas carbonilas (c) nos tecidos do hipocampo, córtex frontal, timo, baço, coração, soro, líquido. Os dados são relatados como média  $\pm$  SEM e foram analisados utilizando testes ANOVA e post-hoc de Tukey (n = 5 animais em cada grupo). Os símbolos indicam resultados estatisticamente significativos \*p < 0,05 em comparação com o grupo controle/salina e #p < 0,05 em comparação com o grupo lesão periapical/salina).

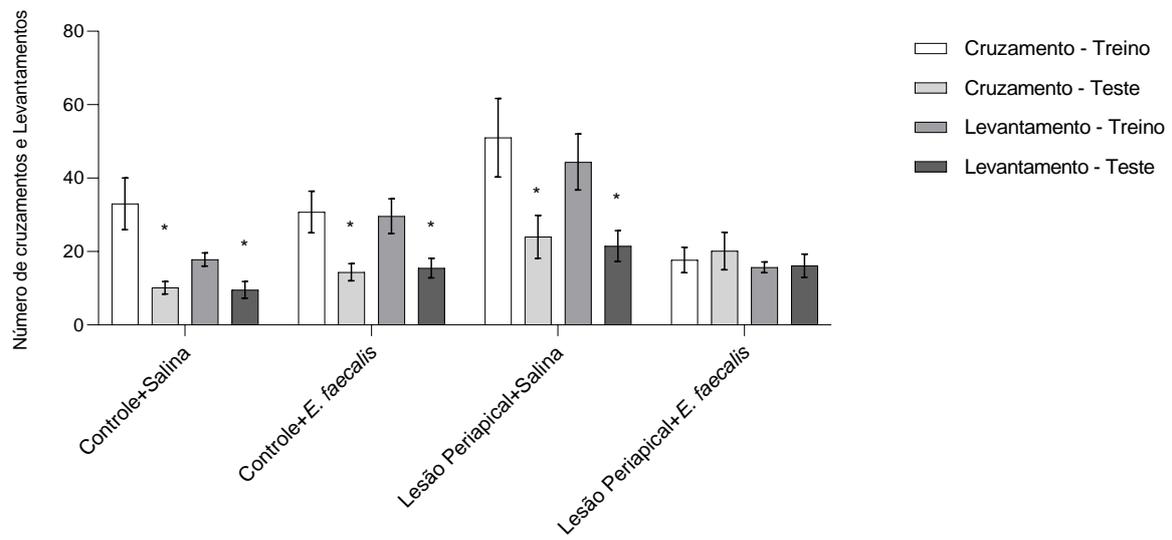
**Figura 3 – Atividade antioxidante em animais submetidos a lesão periapical e a contaminação por *E. faecalis*.** A *E. faecalis* foi induzida através de lesão periapical. Vinte e um dias após os animais foram avaliados as atividades de SOD (a) e CAT (b), nos tecidos do hipocampo, córtex frontal, timo, baço, coração, soro, líquido. Os dados são relatados como média  $\pm$  SEM e foram analisados utilizando testes ANOVA e post-hoc de Tukey (n = 5 animais em cada grupo). Os símbolos indicam resultados estatisticamente significativos \*p < 0,05 em comparação com o grupo controle/salina e #p < 0,05 em comparação com o grupo lesão periapical/salina).

## Legenda de figuras

**Figura 1 Suplementar – Desenho Experimental.** 60 dias após o nascimento, os ratos foram submetidos lesão periapical e associado a *E. faecalis*. Após 21 dias, foram realizados testes comportamentais em campo aberto, reconhecimento de objetos novos e evitação inibitória. Logo depois, os tecidos do hipocampo, córtex frontal, timo, baço, coração, soro e líquido foram extraídos para análise de dano oxidativo.

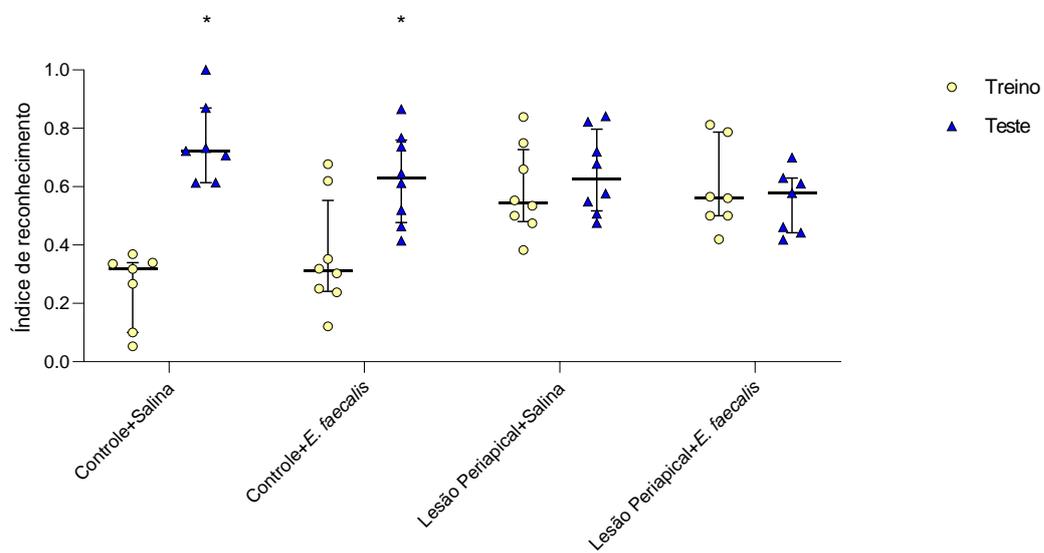
Figura 1

a)



Legenda: Os dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média, no qual: \*:  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle salina.

b)

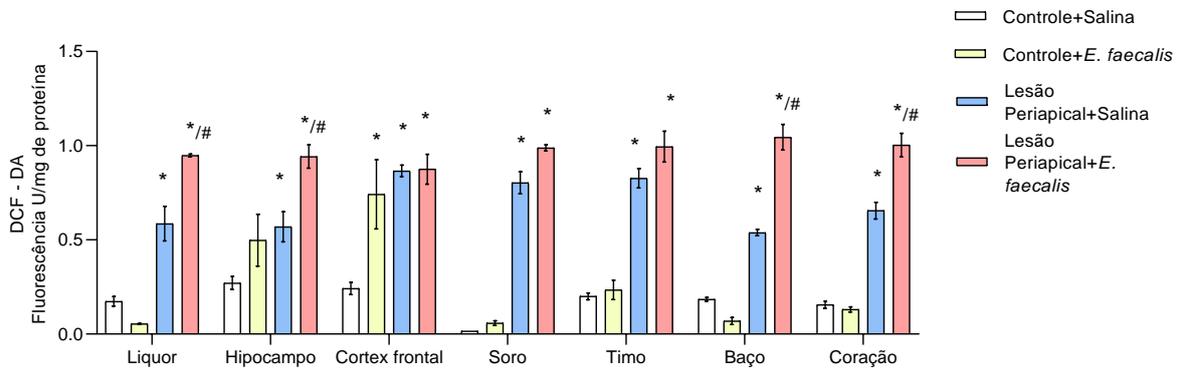


Legenda: Os dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média, no qual: \*:  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle salina.



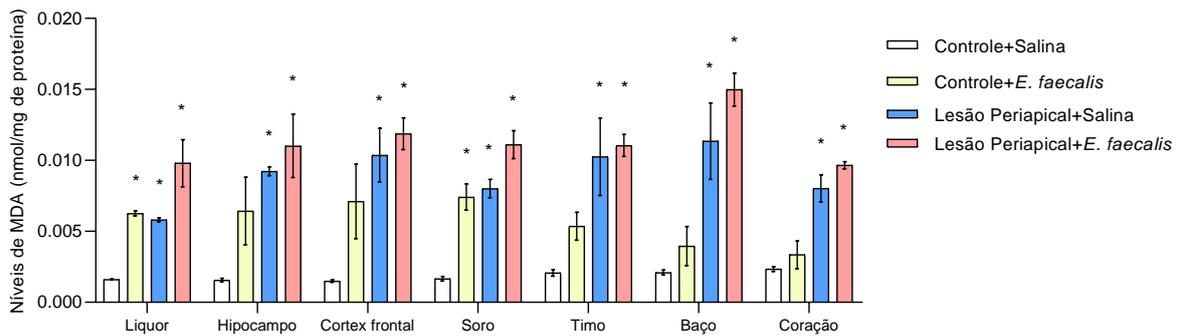
Figura 2

a)



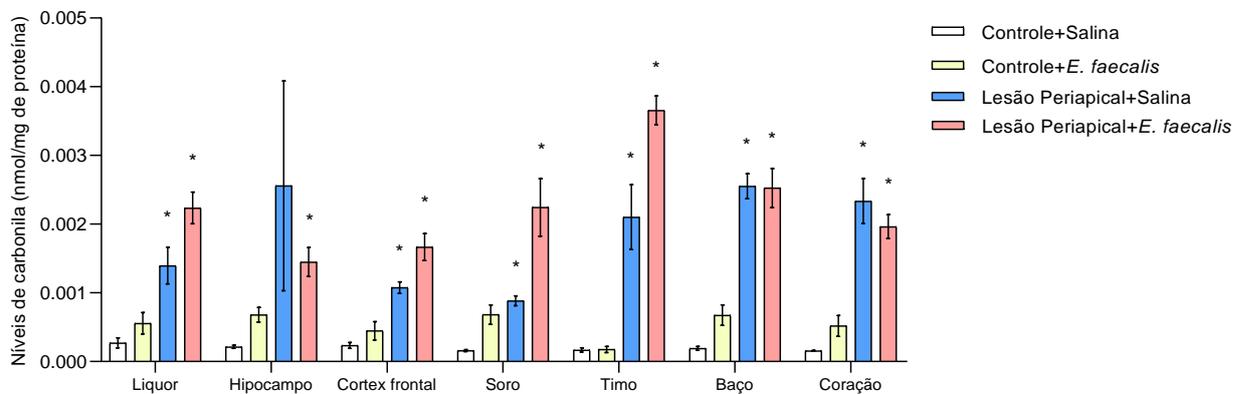
Legenda: Os dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média, no qual: \* :  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle salina. # :  $p < 0,05$  comparado ao grupo lesão periapical+salina.

b)



Legenda: Os dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média, no qual: \* :  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle salina.

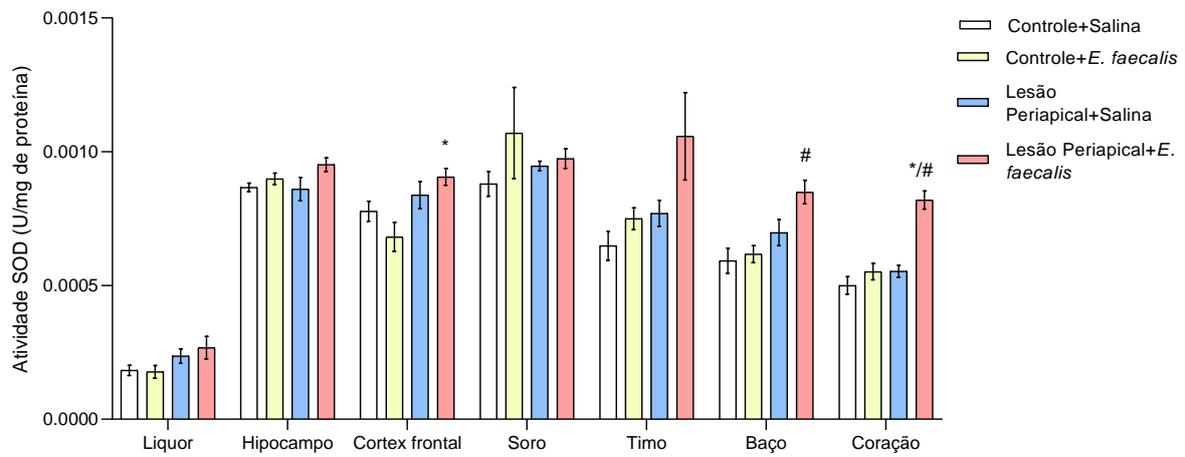
c)



Legenda: Os dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média, no qual: \* :  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle salina.

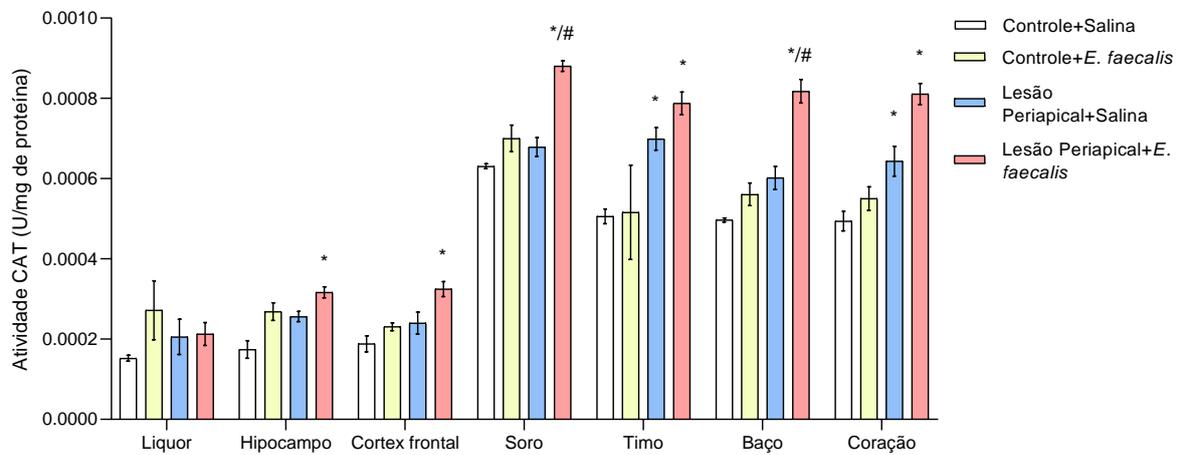
Figura 3

a)

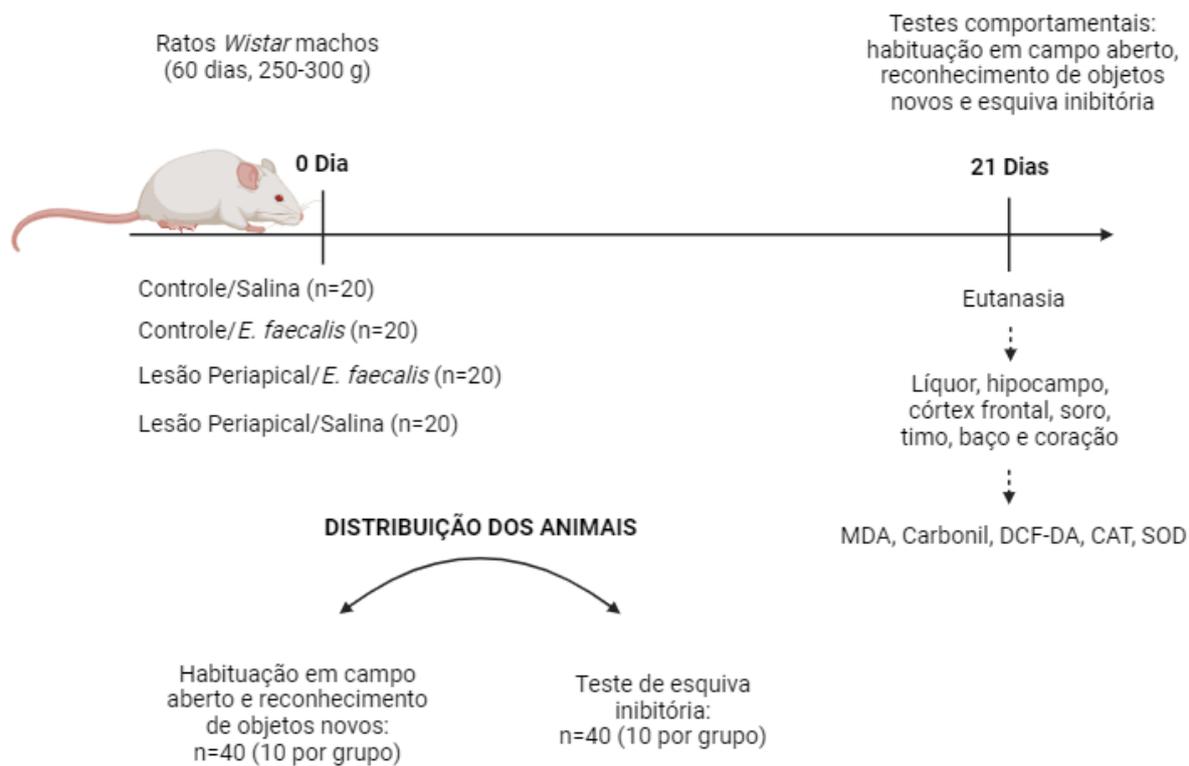


Legenda: Os dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média, no qual: \*:  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle salina. #:  $p < 0,05$  comparado ao grupo lesão periapical+salina.

b)



Legenda: Os dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média, no qual: \*:  $p < 0,05$  comparado ao grupo controle salina. #:  $p < 0,05$  comparado ao grupo lesão periapical+salina.

**Suplementar matéria 1**



Universidade do Extremo Sul Catarinense  
Comissão de Ética no Uso de Animais



#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **14/06/2022**.

<b>Título do projeto</b>	Avaliação da neuroinflamação e de parâmetros comportamentais em modelo de lesão periapical com <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Streptococcus mutans</i> em ratos Wistar adultos machos e fêmeas.
<b>Project title</b>	Evaluation of neuroinflammation and behavioral parameters in a periapical lesion model with <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> and <i>Streptococcus mutans</i> in adult male and female Wistar rats.
<b>Número do protocolo Protocol number</b>	37/2022
<b>Pesquisador principal Principal Investigator</b>	Tatiana Barichello
<b>Pesquisadores Researchers</b>	Jaqueline da Silva Generoso, Karina Marcon, Soraia Netto, Elisa Tassi Mondardo, Renan Antonio Ceretta, Diogo Domingui, Daniel Paulo Bortoluzzi.
<b>Finalidade</b>	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
<b>Vigência da autorização</b>	15/06/2022 a 15/06/2023
<b>Espécie/Inhagem/raça</b>	Rato heterogêneo / Wistar
<b>Idade/Peso</b>	60 dias / 250 – 300g
<b>Número de animais</b>	Feminino 324 e Masculino 162 = 486
<b>Procedência</b>	Biotério UNESC

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail [ceua@unesc.net](mailto:ceua@unesc.net).

Criciúma-SC, 14 de junho de 2022

*Jociane Budni*  
Jociane Budni  
Coordenadora da CEUA