



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

RAYANA DUARTE KHOURY

**PROGRESSÃO DA LESÃO PERIAPICAL EM ANIMAIS SOB
CONDIÇÕES DE ESTRESSE E MODULAÇÃO INFLAMATÓRIA
ATRAVÉS DE BLOQUEADOR ADRENÉRGICO E INIBIDOR
SELETIVO DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA**

RAYANA DUARTE KHOURY

**PROGRESSÃO DA LESÃO PERIAPICAL EM ANIMAIS SOB CONDIÇÕES DE
ESTRESSE E MODULAÇÃO INFLAMATÓRIA ATRAVÉS DE BLOQUEADOR
ADRENÉRGICO E INIBIDOR SELETIVO DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA**

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área: Endodontia. Linha de pesquisa: Estudos Clínicos e Laboratoriais de Materiais e Técnicas Endodônticas.

Orientadora: Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera

Coorientador: Prof. Dra. Renata Falchete do Prado

São José dos Campos

2021

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Khoury, Rayana Duarte

Progressão da lesão periapical em animais sob condições de estresse e modulação inflamatória através de bloqueador adrenérgico e inibidor seletivo da recaptação da serotonina / Rayana Duarte Khoury. - São José dos Campos : [s.n.], 2021.
107 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2021.

Orientador: Marcia Carneiro Valera

Coorientador: Renata Falchete Do Prado

1. Periodontite apical. 2. Estresse crônico. 3. Inibidor seletivo da recaptação da serotonina. 4. Bloqueador beta-adrenérgico. I. Valera, Marcia Carneiro, orient. II. Prado, Renata Falchete Do, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Leopoldo Cosme Silva

Universidade Federal de Alagoas (UFAL)

Faculdade de Odontologia

Campus Maceió

Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Campus de Araçatuba

Prof. Adj. Eduardo Bresciani

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Faculdade de Odontologia

Campus Rio de Janeiro

São José dos Campos, 03 de dezembro de 2021.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais **Fack e Deise**. A vocês, pai e mãe, que me apoiam incondicionalmente e que são meu maior exemplo de coragem e simplicidade. Me ensinaram que a educação é o melhor tipo de herança. Estiveram ao meu lado em todas as minhas dúvidas e incertezas, e permitiram que eu trilhasse os caminhos que eu mesma escolhi, mesmo que isso representasse uma longa distância entre nós. Tudo o que hoje eu sou e conquistei, devo única e exclusivamente a vocês. Minha eterna e mais sincera gratidão por todo sacrifício. Amo vocês.*

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Agradeço à minha orientadora **Profa. Marcia Carneiro***

***Valera** por ter acreditado na minha capacidade sem muito me conhecer e que me abriu as portas para a primeira oportunidade de seguir o sonho de me tornar professora. Obrigada pela confiança no meu trabalho, pela disponibilidade e dedicação. Agradeço o apoio incondicional prestado a mim e aos meus colegas, sempre se envolvendo de forma interessada e pertinente na realização dos nossos trabalhos. As suas críticas construtivas, conversas e reflexões foram fundamentais para a minha formação como pesquisadora e educadora, e para o meu crescimento pessoal. Seu exemplo como profissional e seu amor à docência me inspiram a ser uma profissional competente, de caráter e humana. Foi uma verdadeira honra ser sua orientada e espero que a nossa parceria seja para a vida. Serei eternamente grata à Deus por ter colocado a senhora no meu caminho.*

Obrigada por tudo Professora!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me dar forças para viver, por me capacitar e poder trazer essa vitória para minha vida. Sei que ao Seu lado, irei muito mais longe. Agradeço por abençoar com muita saúde a mim, meus pais e irmãos, e por tê-los protegido de todos os males para que eu pudesse seguir com o coração tranquilo durante essa jornada.

Aos meus pais, **Faek e Deise**, por todo o suor do trabalho dedicado a investir na minha educação e dos meus irmãos. A vocês que nos deram a vida e nos ensinaram a vivê-la com simplicidade, dignidade e honestidade. A vocês que renunciaram aos seus sonhos, para que pudéssemos realizar os nossos. A minha gratidão por vocês jamais será traduzida em palavras. Que Deus me conceda a graça de retribuir todo amor, carinho e dedicação que vocês tiveram por mim.

Aos meus amados irmãos **Raony e Rayra**, que também me incentivaram a seguir este caminho da docência. Vocês são sem dúvida a melhor parte de mim. A nossa amizade é verdadeira e eterna e isso me dá forças para seguir em frente. Vocês são a minha melhor companhia, o meu porto seguro e a certeza de que nunca estarei só nesse mundo. Agradeço também a minha cunhada **Helena**, pelas trocas e conversas. Você é para mim uma grande inspiração, como mulher e profissional competente.

À minha querida avó **Zilda**, que é meu maior exemplo de força e independência. Me orgulho muito e me inspiro com a sua história. Obrigada pela companhia de tantos anos, pelas orações diárias e por me encher de carinho cada vez que retorno para casa. Te amo muito vovó.

Ao meu marido **Paulo**, por me apoiar incondicionalmente e ser um grande incentivador na minha carreira profissional como pesquisadora e docente. Obrigada pela compreensão, pela parceria e por me dar tanto carinho! Eu tenho muito orgulho da nossa história e de ver o quanto crescemos e conquistamos juntos. Reconheço todo o seu sacrifício para que eu pudesse estar aqui hoje, contando essa vitória. Dividir a vida com você durante esses anos tornou essa trajetória muito mais leve! Te amo muito meu amor.

Ao **Leopoldo**, meu grande amigo desde os tempos de faculdade e que acabou se tornando um grande parceiro da vida acadêmica. É uma grande honra para mim ter você como amigo, padrinho de casamento, e ao mesmo tempo poder dividir com você as experiências da pós-graduação. Obrigada por tanta partilha, pelo incentivo e pelo tempo ensaiando comigo aulas, apresentações etc. Para mim é um grande orgulho poder contar com você hoje, como membro da minha banca de doutorado.

Aos meus amigos **Amjad, Bruna, Cassia, Esteban**. Conviver com vocês foi a melhor parte da pós-graduação. Fico muito feliz pela amizade e parceria que cultivamos. Tenho certeza de que será para

sempre. Agradeço em especial à **Giovanna Minhoto**, a quem devo parte deste trabalho. Obrigada pelo comprometimento, por toda ajuda e paciência. A sua amizade e parceria foi um verdadeiro presente para mim durante a pós-graduação e que agora espero levar comigo para a vida.

Aos demais colegas da pós-graduação, **Carol Gagliardi, Carol Trefiglio, Gustavo Guerrero, Fernando, Felipe M., Felipe A. e Thaís**, que dividiram comigo as tardes e noites no laboratório de Endodontia e que tornaram essa experiência ainda mais divertida.

A **Profa. Dra. Renata Falchete do Prado**, que como minha co-orientadora foi uma grande contribuinte para o meu crescimento como pesquisadora desde o mestrado. Obrigada Re, nunca vou me esquecer da sua enorme participação na minha formação.

Aos demais professores da disciplina de Endodontia: **Prof. Cláudio Antonio Talge Carvalho e Profa. Adj. Ana Paula Martins Gomes**, por todo conhecimento clínico e científico compartilhado, pelos ensinamentos transmitidos e atenção dispensada sempre que solicitada. Pela atenção, dedicação e exemplo, sempre com uma palavra de incentivo. Vocês certamente contribuíram para minha formação acadêmica e me inspiram como docente.

As professoras que fizeram parte da minha banca de qualificação, **Profa. Ana Lia Anbinder e Profa Juliana Junqueira**, pelos apontamentos pertinentes que engradeceram este estudo. Agradeço também pela disponibilidade em me ajudar sempre que as procurei. Vocês são excelentes profissionais e terão minha eterna admiração.

A **Profa. Patrícia Pimentel de Barros** que me auxiliou em grande parte desse projeto. Obrigada por compartilhar seu tempo e seus conhecimentos contribuindo de maneira determinante para a realização deste trabalho. Apesar do pouco tempo que trabalhamos juntas, nossas conversas foram fundamentais para que eu pudesse expandir meus horizontes sobre o futuro que esta por vir. Você se tornou uma inspiração para mim e espero poder continuar com a nossa parceria para além do doutorado!

Ao **Prof. Adj. Eduardo Bresciani**, a sua infinita paciência, carisma e a grande amizade que cultivamos durante esse tempo. Há pessoas que marcam a nossa trajetória, que despertam algo especial em nós, que abrem nossos olhos de modo irreversível e transformam a nossa maneira de ver a vida. Você foi uma dessas pessoas! Os seus ensinamentos foram muito além dos conteúdos de estatística e soube despertar a minha admiração de um modo único. Muito obrigada por tudo e por ter aceitado fazer parte da minha banca.

Ao **Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho e Prof. Dr. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva** por terem aceitado prontamente fazer parte da minha banca, contribuindo com seus vastos conhecimentos na avaliação deste trabalho. É uma honra contar com a participação de vocês neste

dia. Muito obrigada pela disponibilidade.

À todos os funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP, às técnicas do departamento **Josiana Carneiro**, e à secretária do departamento, **Liliane Franchitto**, ao pessoal da Secretaria da Pós-Graduação, **Bruno Tanaka**, **Sandra Cordeiro e Carolina Reis** pelas informações e atenção prestadas, ao pessoal da esterilização e às funcionárias da limpeza. Vocês são parte fundamental na realização do trabalho de cada um dos alunos dentro desta instituição. Ao **Sr. Carlos Guedes** do Apoio à Fapesp por sempre me atender prontamente, fornecendo informações e orientações imprescindíveis. Vocês facilitam muito a realização do nosso trabalho. Muito obrigada.

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, através de seu Diretor, **Prof. Dra. Rebeca Di Nicoló**, e ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora, sob coordenação do **Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio recebido no início do doutorado (Código de Financiamento 001) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - **FAPESP**- que me concedeu a bolsa de doutorado (Processo nº 2018/10339-0).

E a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

*"Para ser grande, sê inteiro:
nada Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive."*

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Bloqueadores beta-adrenérgicos.....	22
2.2 Inibidores seletivos da recaptação da serotonina.....	24
3 PROPOSIÇÃO	28
3.1 Geral	28
3.2 Específica.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Animais.....	29
4.1.1 Grupos experimentais.....	29
4.2 Indução do estresse crônico	31
4.3 Indução da Periodontite Apical	32
4.4 Massa corporal dos animais.....	33
4.5 Eutanásia e coleta das amostras	34
4.6 Análise dos níveis séricos de corticosterona por Radioimunoensaio	36
4.7 Análise dos níveis séricos hormonais e inflamatórios por ensaio multiplex.....	37
4.8 Análise da estrutura óssea periapical por micro-CT	38
4.9 Análise histológica.....	40
4.10 Análise da expressão gênica de citocinas inflamatórias na lesão periapical por RT-PCR.....	42
4.10.1 Extração de RNA.....	44
4.10.2 Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR).....	45
4.10.3 PCR em Tempo Real (qPCR)	46
4.10.3.1 Análise da eficiência da reação de PCR em Tempo Real.....	46
4.10.3.2 Reação de PCR	46

4.11 Análise estatística	48
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Massa corporal	50
5.2 Níveis séricos de corticosterona por RIA.....	53
5.3 Níveis séricos hormonais e inflamatórios por ensaio Multiplex	54
5.4 Estrutura óssea periapical por micro-CT	59
5.5 Análise histológica.....	61
5.6 Expressão gênica de biomarcadores da reabsorção óssea e citocinas inflamatórias por RT-PCR.....	66
6 DISCUSSÃO	70
6.1 Modelo animal de PA e estresse crônico	71
6.2 Monitoramento da massa corporal	72
6.3 Dosagem hormonal de biomarcadores de estresse.....	73
6.4 Níveis séricos de citocinas inflamatórias.....	77
6.5 Avaliação histológica e microtomográfica da lesão periapical	78
6.6 Avaliação da expressão gênica de biomarcadores da reabsorção óssea e citocinas inflamatórias por RT-PCR.....	80
7 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS.....	88
ANEXO.....	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma do desenho do estudo	31
Figura 2 – Indução da PA	33
Figura 3 – Identificação dos animais	34
Figura 4 – Processamento técnico para obtenção do soro sanguíneo	35
Figura 5 – Dissecção das amostras	36
Figura 6 – Imagem do programa DataViewer® utilizada para visualização da orientação padrão da imagem em três planos.....	39
Figura 7 – Representação ilustrativa do ROI personalizado delineado manualmente circundando a lesão periapical com margem de segurança no eixo sagital	40
Figura 8 – Imagens representativas da análise histomorfométrica da lesão periapical	41
Figura 9 – Imagem extraída do website para a seleção de controle endógeno	44
Figura 10 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores de massa corporal dos animais no início do experimento	51
Figura 11 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores de massa corporal dos animais ao final do experimento	51
Figura 12 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores de ganho de massa corporal dos animais durante o experimento	52
Figura 13 – Representação gráfica da evolução do ganho de massa corporal dos animais ao longo do experimento	52
Figura 14 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores de corticosterona sérica (ng/ml) dos animais	54
Figura 15 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores dos níveis séricos dos biomarcadores de estresse analisados por ensaio Multiplex	56
Figura 16 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores dos níveis séricos de citocinas inflamatórias nos grupos NS e SS analisados por ensaio Multiplex.....	58
Figura 17 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores dos níveis séricos de citocinas inflamatórias nos grupos estressados (SS, SF, SP e SFP) analisados por ensaio Multiplex	59

Figura 18 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores dos parâmetros analisados por micro-CT	61
Figura 19 – Representação dos aspectos histológicos de cada grupo após coloração com hematoxilina e eosina.....	63
Figura 20 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores dos parâmetros histológicos avaliados	65
Figura 21 - Expressão gênica de RANKL OPG e TRAP	67
Figura 22 - Expressão gênica das citocinas inflamatórias IL-6 IL-10 e IL-17	68
Figura 23 - Expressão gênica de MMP-8 e MMP-13.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de massa corporal dos animais no início (g), ao final do experimento (g) e ganho de massa corporal (%) representados pela média e desvio padrão (DP) de cada grupo	50
Tabela 2 – Valores do nível de corticosterona sérica (ng/ml) analisados por RIA representados pela média e desvio padrão (DP) de cada grupo.....	53
Tabela 3 – Valores dos níveis séricos de hormônios biomarcadores de estresse analisados por ensaio Multiplex e representados pela média e desvio padrão (DP) de cada grupo.....	55
Tabela 4 – Valores dos níveis séricos de citocinas inflamatórias analisados por ensaio Multiplex e representados pela média e desvio padrão (DP) de cada grupo	57
Tabela 5 – Valores obtidos em relação aos diferentes parâmetros analisados por micro-CT representados pela média e desvio padrão (DP) de cada grupo	60
Tabela 6 – Valores obtidos em relação aos diferentes parâmetros histológicos analisados em cada grupo.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
IL	Interleucina
ISRS	Inibidor seletivo da recaptação de serotonina
OPG	Osteoprotegerina
PA	Periodontite Apical
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa
TLR4	Receptor Toll-like 4
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato

Khoury RD. Progressão da lesão periapical em animais sob condições de estresse e modulação inflamatória através de bloqueador adrenérgico e inibidor seletivo da recaptação da serotonina [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2021.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos do estresse crônico sobre a periodontite apical (PA) induzida em ratos, e avaliar os efeitos do uso da Fluoxetina (antidepressivo da classe dos inibidores da recaptação de serotonina) e do Propranolol (bloqueador beta-adrenérgico), associados ou não, na modulação inflamatória e na reabsorção óssea periapical de ratos estressados. Foram utilizados 40 ratos divididos em cinco grupos: Grupo controle não-estressado (NS); Grupo controle estressado com administração de solução fisiológica (SS); Grupo estressado com administração de Fluoxetina (SF); Grupo estressado com administração de Propranolol (SP); Grupo estressado com administração de Fluoxetina e Propranolol (SFP). Os animais dos grupos estressados foram submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível durante 6 semanas e as respectivas medicações foram administradas diariamente, via gavagem, ao longo de todo o período experimental. A PA foi induzida em todos os grupos após 21 dias do início do protocolo de estresse e ao final da 6ª semana, os animais foram eutanasiados e as hemimandíbulas e hemimaxilas removidas. Posteriormente foram realizadas as seguintes análises: a) da massa corporal; b) dos níveis séricos de corticosterona por radioimunoensaio; c) dos níveis séricos hormonais e inflamatórios por ensaio Multiplex; e) histomorfométrica por coloração com hematoxilina e eosina; f) da estrutura óssea periapical através de microtomografia computadorizada (micro-CT); g) da expressão gênica de biomarcadores relacionados à atividade osteoclástica, citocinas inflamatórias e metaloproteinases na região periapical por RT-PCR. Ao final do experimento os animais estressados apresentaram menor ganho de massa corporal, níveis séricos de ACTH significativamente mais altos, atividade inflamatória mais intensa e maiores volumes de lesão periapical quando comparados aos animais do grupo controle NS. Os grupos tratados SF, SP e SFP apresentaram menores volumes de lesão periapical quando comparados ao grupo controle SS, e o grupo SP apresentou menor intensidade do infiltrado inflamatório. O teste de RT-PCR mostrou maior expressão de RANKL e TRAP no grupo controle SS, bem como maior expressão de IL-6, IL-10 e IL-17 e MMP-8 quando comparado ao grupo controle NS. Na comparação em relação ao grupo controle SS, o grupo SF apresentou maior expressão de OPG, e menor expressão de IL-6 e IL-17; o grupo SP apresentou maior expressão de OPG e menor expressão de IL-6, IL-10, IL-17, MMP-8 e MMP-13, e o grupo SFP apresentou menor expressão de RANKL, TRAP, IL-6, IL-10, IL-17, MMP-8 e MMP-13. Foi concluído que o estresse crônico influenciou negativamente a patogênese da PA e ambos os medicamentos avaliados, bem como sua associação, tiveram efeitos positivos na prevenção da perda óssea e modulação inflamatória.

Palavras-chave: Periodontite apical. Estresse crônico. Inibidor seletivo da recaptação de serotonina. Bloqueador beta-adrenérgico.

Khoury RD. Progression of periapical lesion in animals under stress conditions and inflammatory modulation through adrenergic blocker and selective serotonin reuptake inhibitor [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2021.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the effects of chronic stress on induced apical periodontitis (AP) in rats, and to evaluate the effects of the use of fluoxetine (antidepressant known as selective serotonin reuptake inhibitor), and of Propranolol (beta-adrenergic blocker), associated or not, in inflammatory modulation and periapical bone resorption in stressed rats. Forty rats were divided into five groups: Unstressed control group (NS); Stressed control group with saline solution administration (SS); Stressed group with administration of Fluoxetine (SF); Stressed group with administration of Propranolol (SP); Stressed group with administration of Fluoxetine and Propranolol (SFP). The animals in the stressed groups were submitted to the unpredictable chronic stress paradigm for 6 weeks and the respective medications were administered daily, via gavage, throughout the entire experimental period. AP was induced in all groups, 21 days after the beginning of the stress paradigm, and at the end of the 6th week, the animals were euthanized and the hemi-mandibles removed for the following analyses: a) body weight b) serum corticosterone levels by radioimmunoassay; c) hormone and inflammatory serum levels by Multiplex assay; e) histomorphometric staining with hematoxylin and eosin; f) the periapical bone structure through computerized microtomography; g) gene expression related to osteoclastic activity, inflammatory cytokines and metalloproteinases in the periapical region by RT-PCR. At the end of the experiment, the stressed animals showed lower body weight gain, significantly higher levels of ACTH, more intense inflammatory infiltrate and higher volumes of periapical lesion when compared to animals in the NS control group. The treated groups SF, SP and SFP had smaller volumes of periapical lesion when compared to the SS control group and the SP group had lower intensity of inflammatory infiltrate. The RT-PCR test showed higher expression of RANKL and TRAP in the stressed control group, as well as higher expression of IL-6, IL-10, IL-17 and MMP-8 when compared to the NS control group. In comparison with the SS control group, the SF group showed higher expression of OPG, and lower expression of IL-6 and IL-17; the SP group showed higher expression of OPG and lower expression of IL-6, IL-10, IL-17, MMP-8 and MMP-13 and the SFP group showed lower expression of RANKL, TRAP, IL-6, IL-10, IL-17, MMP-8 and MMP-13. It was concluded that chronic stress negatively influenced the pathogenesis of apical periodontitis and both medications evaluated, as well as its association, had positive effects in preventing bone loss and inflammatory modulation.

Keywords: Apical periodontitis. Chronic stress. Selective serotonin reuptake inhibitors. Adrenergic beta-blocker.

1 INTRODUÇÃO

A periodontite apical (PA) de origem endodôntica é uma doença inflamatória caracterizada pela resposta imune do hospedeiro frente à infecção microbiana no sistema de canais radiculares (Nair, 2004). As toxinas bacterianas e os subprodutos metabólicos nocivos que egressam dos canais radiculares para a região periapical ativam o sistema imune através da interação com receptores de reconhecimento padrão ou Toll-like 4 (TLR4), que estão presentes em diversas células do hospedeiro (Rôças et al., 2014). A reação inflamatória decorrente dessa interação, embora importante para localizar e eliminar o microrganismo, induz a liberação de diversos mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e neuropeptídeos. Esses mediadores modulam de forma independente ou cooperativa a atividade proteolítica e ativam os mecanismos de reabsorção óssea, resultando no desenvolvimento de lesões osteolíticas características da PA (Fukada et al., 2009; Graves et al., 2011; Menezes et al., 2006).

A resposta imunoinflamatória frente a infecção endodôntica é uma interação dinâmica altamente complexa entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e as injúrias microbianas. A ativação das vias não antigênicas e antigênicas induz as respostas imunológicas inata e adaptativa, respectivamente, que combinam elementos celulares protetores e destrutivos durante o processo inflamatório periapical (Gemmell et al., 2007; Kinane et al., 2007; Kornman et al., 1997). Nesse sentido, a reabsorção óssea induzida pela inflamação nos tecidos periapicais é também acompanhada pelo recrutamento de células do sistema imunológico, que constituem uma linha de defesa contra a disseminação da invasão microbiana oriunda do canal radicular (Márton et al., 2000). Portanto, a ação simultânea das respostas imunológicas pró e anti-inflamatória é determinante para a patogênese da PA, uma vez que os mecanismos moleculares envolvidos podem influenciar na intensidade das respostas de defesa do hospedeiro e no equilíbrio dinâmico entre a proteção contra infecção, progressão da lesão e reparo tecidual (Francisconi et al., 2016; Márton et al., 2000).

Estudos epidemiológicos demonstram que a PA afeta os indivíduos de uma população de diferentes maneiras (Färkkilä et al., 2019; Kirkevang, Wenzel, 2003).

Estes dados reforçam a premissa de que embora o papel das bactérias seja bem estabelecido na etiologia e no desenvolvimento da PA, a severidade, a progressão e o reparo da doença periapical podem ser fortemente determinados por fatores que estão relacionados à resposta individual do hospedeiro (Karteva, Manchorova-Veleva, 2020). Nesse contexto, diversas pesquisas têm sido realizadas ao longo das últimas décadas a fim de identificar diferentes fatores de risco, de natureza biológica, comportamental ou ambiental, que possam interferir na resposta imunológica do hospedeiro e, conseqüentemente, influenciar a patogênese da PA (Azuma et al., 2017; Cintra et al., 2018; Dal-Fabbro et al., 2019; Pinto et al., 2020b, 2020a; Segura-Egea et al., 2015).

Fatores psicossociais como estresse, ansiedade e depressão, também vêm sendo frequentemente apontados como fatores de risco adicionais uma vez que se mostram capazes de desencadear respostas imunológicas que favorecem a ocorrência ou exacerbação de alterações inflamatórias, incluindo a periodontite (Ardila, Guzmán, 2016; Bakri et al., 2013; Boyapati, Wang, 2007; Mousavijazi Mahvash et al., 2013; Rosania et al., 2009). Apesar de alguns estudos observacionais apoiarem este tipo de correlação, os mecanismos de influência dos fatores psicológicos ainda não foram devidamente elucidados na literatura (Castro et al., 2020). Na Endodontia, estudos recentes em modelos animais sugeriram que o estresse pode favorecer a progressão da PA (Gomes et al., 2019; Khoury et al., 2020). No entanto, as evidências disponíveis ainda são escassas e frágeis devido às variações metodológicas e a falta de padronização na definição de exposição aos estressores (Minhoto et al., 2021).

O conceito de estresse foi introduzido pela primeira vez por Hans Selye (1946, 1936). Por definição, o estresse é uma condição dinâmica caracterizada por um conjunto de reações fisiológicas do organismo, em resposta a diferentes estímulos (estressores), que podem ser de natureza física ou emocional. Entretanto, em determinadas situações, essas reações podem exceder a capacidade do indivíduo de lidar efetivamente com a situação e, portanto, o padrão e a magnitude da resposta do hospedeiro frente ao estresse podem ser influenciados por diversos fatores, como a duração da exposição ao estresse (agudo ou crônico), o tipo de estresse (físico ou psicológico), gênero do paciente, e outros fatores (Joëls, Baram, 2009).

O estresse e outras condições psicossociais relacionadas, como a ansiedade e depressão, são problemas que estão cada vez mais prevalentes na vida moderna (Chang, Lu, 2007). A Associação Americana de Psicologia (2013), relatou que 90% dos jovens americanos são estressados sendo que 20% da população americana apresentam alto nível de estresse. Além disso, de acordo com o estudo realizado pelo Instituto de Psicologia e Controle do Stress (2014), 34,26% dos brasileiros consideram que estão experimentando estresse extremo. Da mesma forma, a PA também apresenta alta prevalência mundial considerando que metade da população mundial apresenta pelo menos um dente com infecção endodôntica (Tibúrcio-Machado et al., 2020).

Diante da grande diversidade de fatores estressores, de âmbito psicológico e emocional, juntamente com as dificuldades de adaptação do indivíduo, as condições de estresse e a sua complexa relação com o sistema imunológico têm recebido atenção especial por parte dos pesquisadores na área da saúde (Glaser, Kiecolt-Glaser, 2005). As consequências da resposta ao estresse são geralmente adaptativas e cessam após algum tempo. No entanto, quando o estresse é crônico ou de longa duração, a ativação excessiva das vias neuroendócrinas relacionadas ao estresse induz a liberação, também excessiva, de determinados hormônios e neurotransmissores que podem exercer efeitos prejudiciais sobre as funções imunológicas (Dhabhar, 2002; Dhabhar et al., 2010; Dhabhar, McEwen, 1997; Frick et al., 2009; Webster Marketon, Glaser, 2008). Nesse sentido, os agentes causadores de estresse podem influenciar na patogênese das doenças infecciosas através de dois mecanismos: ou por causarem estados afetivos negativos (depressão), os quais teriam efeitos diretos no comportamento; ou por modularem a resposta do sistema imune frente à infecção através da liberação de hormônios ou neurotransmissores no sangue (Bakri et al., 2013; Mousavijazi Mahvash et al., 2013; Rohini et al., 2015).

Os eixos hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o Sistema Nervoso Simpático (SNS) são as principais vias neurais ativadas por fatores de estresse físico e psicológico (Ader et al., 1995; Black, 1994; Chrousos, 1995). A ativação do eixo HPA resulta em aumento dos níveis circulatórios do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) produzido pela hipófise, bem como dos hormônios mineralocorticoides e glicocorticoides (principalmente cortisol em humanos e corticosterona em roedores),

derivados do córtex adrenal. Em contraste, a ativação do SNS resulta na liberação de catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) dos terminais nervosos simpáticos, incluindo o trato gastrointestinal e os tecidos linfoides. Segundo Webster Marketon e Glaser (2008), o aumento de hormônios neuroendócrinos relacionados ao estresse afeta as funções imunológicas através da inibição da quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos, células apresentadoras de antígenos, células natural-killer (NK), linfócitos T e B, além de regular negativamente a produção de citocinas necessárias para a geração de respostas imunes adaptativas.

Nesse sentido, diversas pesquisas no campo da neuroimunomodulação vêm sendo realizadas a fim de investigar o efeito de diferentes agentes terapêuticos sobre as vias neuroendócrinas ativadas em resposta ao estresse. Estes estudos destacam a relevância do tratamento farmacológico do estresse e suportam a hipótese de que certas drogas psicotrópicas podem reverter, de forma direta ou indireta, os efeitos adversos desencadeados pelas psicopatias e modular a resposta do hospedeiro sobre determinadas doenças inflamatórias, incluindo a periodontite (Golub et al., 1998; Holzhausen et al., 2002; Leitão et al., 2005; Reddy et al., 2003).

Os inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRSs) representam uma classe de fármacos amplamente utilizada no tratamento da depressão (Aguilar et al., 2013). A Fluoxetina é um medicamento antidepressivo da classe dos ISRSs desenvolvida para aumentar a sinalização central da serotonina, uma via conhecida por favorecer o acúmulo de massa óssea (Calil, 2001; Oury et al., 2010; Yadav et al., 2009). Além disso, estudos também mostraram alguns efeitos pleiotrópicos da Fluoxetina que apresentou propriedades adicionais como efeitos analgésico, anti-inflamatório e imunomodulador (Abdel-Salam et al., 2003; Roumestan et al., 2007; Yaron et al., 1999). Segundo Sacre et al. (2010), a Fluoxetina é capaz de inibir seletivamente alguns receptores sinalizadores (ex. Toll-like) presentes nas células e reduzir a produção de citocinas inflamatórias.

A via de sinalização adrenérgica também tem sido alvo de diversos estudos que visam a modulação inflamatória diante do quadro de estresse (Khoury et al., 2020; Lu et al., 2016). As catecolaminas liberadas durante a descarga adrenérgica induzida pelo estresse se ligam aos receptores adrenérgicos presentes nas células humanas, incluindo osteoblastos e osteoclastos (Moore et al., 1993; Takeda et al., 2002).

Os bloqueadores beta-adrenérgicos, constituem uma classe terapêutica que apresentam como principal mecanismo de ação, o bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos. O Propranolol é um medicamento bloqueador beta-adrenérgico formalmente indicado como coadjuvante no tratamento de pacientes hipertensos com cardiopatia associadas. Entretanto, diversos estudos já demonstraram a sua capacidade em exercer efeitos positivos na regulação da reabsorção óssea (Okada et al., 2010; Rodrigues et al., 2012).

Diante do exposto, verifica-se a importância de elucidar os mecanismos biológicos pelos quais o estresse crônico pode debilitar a saúde sistêmica ou exacerbar a progressão da doença visto que tais investigações podem auxiliar no desenvolvimento de tratamentos biocomportamentais e farmacológicos destinados a melhorar ou eliminar os efeitos nocivos do estresse crônico sobre determinadas doenças inflamatórias, como por exemplo, a PA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bloqueadores beta-adrenérgicos

Os bloqueadores beta-adrenérgicos constituem uma classe de fármacos que têm em comum a função de bloquear os receptores beta-adrenérgicos, que são por sua vez, os principais alvos das catecolaminas, particularmente, a adrenalina (epinefrina) e noradrenalina (norepinefrina). Diversas células apresentam estes receptores que quando ligados às catecolaminas geralmente induzem um estímulo simpático, ou seja, uma resposta de luta ou fuga, característica da reação de estresse agudo.

O Propranolol é um bloqueador beta-adrenérgico não-seletivo largamente utilizado no tratamento da hipertensão arterial. Em 1991, Minkowitz et al. descreveram pela primeira vez os efeitos do Propranolol sobre o metabolismo ósseo *in vivo*. Os autores não só comprovaram a existência de uma regulação óssea pelos receptores beta-adrenérgicos como também demonstraram que o Propranolol pode estimular sistemicamente o metabolismo ósseo de ratos ou afetar diretamente os osteoblastos por meio da sinalização beta-adrenérgica.

Desde então, diversos estudos investigaram o efeito do Propranolol na perda óssea a fim de elucidar o envolvimento do sistema nervoso simpático em doenças infecciosas como por exemplo, a periodontite. Após a demonstração do envolvimento do sistema nervoso simpático na remodelação óssea e das respostas imuno-inflamatórias, diversas pesquisas foram realizadas a fim de investigar os efeitos do bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos na doença periodontal.

Seguido da demonstração do impacto negativo do estresse de “contenção” sobre a perda óssea alveolar em um modelo experimental de periodontite (Nakajima et al., 2006), Okada et al. (2010) investigaram os efeitos do bloqueio adrenérgico na perda óssea exacerbada pela sinalização simpática causada pelo estresse. De acordo com os autores, o bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos no tecido periodontal através da administração do Propranolol (1 mg/kg/dia) por 22 dias foi capaz de inibir a diferenciação osteoclástica prevenindo a perda óssea alveolar

induzida pela infecção de *Porphyromonas gingivalis*.

Rodrigues et al. (2012) investigaram os efeitos de diferentes doses de Propranolol na reabsorção óssea de ratos com periodontite experimental a fim de esclarecer o seu mecanismo de ação sobre a doença periodontal. Os autores demonstraram que o bloqueio dos adrenoreceptores com uma dose baixa de Propranolol pode suprimir a reabsorção do osso periodontal através da inibição da osteoclastogênese mediada por RANKL, bem como regular marcadores inflamatórios locais, sem afetar os parâmetros hemodinâmicos.

Lu et al. (2014) avaliaram os níveis de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-8) após o pré-tratamento com bloqueadores α 1/ β 2 adrenérgicos (Fentolamina/Propranolol) na doença periodontal induzida em ratos estressados e estimulados com LPS. Os resultados mostraram que houve um efeito significativo da Fentolamina em relação às citocinas envolvidas na inflamação uma vez que o bloqueador α 1-AR anulou significativamente os aumentos de IL-1 β , IL-6 e IL-8 exacerbados pelo estresse crônico, enquanto o bloqueador β 2-AR Propranolol não afetou os níveis de nenhuma das citocinas avaliadas. A partir dos resultados, os autores sugerem que a progressão acelerada da doença periodontal causada pelo estresse crônico está principalmente ligada a via de sinalização α 1-adrenérgica.

No estudo de Martins et al. (2017) os autores observaram que o uso do isoproterenol, um β -agonista não-seletivo, aumentou a perda óssea alveolar em modelo animal de doença periodontal. Entretanto, a administração do Propranolol (0,1 mg / kg) no modelo utilizado não foi capaz de modular significativamente a resposta do hospedeiro.

Rodrigues et al. (2019) buscaram determinar o efeito do Propranolol em relação aos parâmetros hematológicos, citocinas sistêmicas e níveis de proteína C reativa em um modelo experimental de periodontite. Os autores reportaram que embora os parâmetros hematológicos não tenham sido afetados, baixas doses de Propranolol foram capazes de suprimir a produção sistêmica de proteína C-reativa, TNF- α e IL-6.

Em um modelo experimental de avulsão, Matos et al. (2020) investigaram os efeitos do bloqueio alfa e beta-adrenérgico no processo de reparo de incisivos de rato após o reimplante tardio. Previamente ao reimplante, os incisivos foram tratados com gel de fentolamina (bloqueador alfa-adrenérgico) ou Propranolol, manipulados

com carboximetilcelulose (veículo) em diferentes concentrações. Os autores observaram que a atividade osteoclástica foi significativamente menor nos grupos tratados com ambos os bloqueadores adrenérgicos na concentração de 10 µg/mL.

Khoury et al. (2020) investigaram pela primeira vez a influência da administração sistêmica de bloqueadores adrenérgicos na modulação inflamatória e no processo de reabsorção óssea durante o desenvolvimento de lesões periapicais em ratos. Os animais receberam injeções diárias de Propranolol (0,1 mg/kg/dia) ou Fentolamina (0,1 mg/kg/dia) por 28 dias. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas em relação à resposta inflamatória, ambos os grupos tratados com bloqueadores adrenérgicos apresentaram redução da diferenciação osteoclástica. De acordo com os autores, embora os resultados obtidos confirmem a influência da via de sinalização adrenérgica no desenvolvimento da PA, mais estudos são necessários para explorar os mecanismos subjacentes envolvidos nesta relação.

2.2 Inibidores seletivos da recaptação da serotonina

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é uma molécula biológica sintetizada pelas células no Sistema Nervoso Central e no trato gastrointestinal, e que está envolvida em diversas doenças psicológicas, tais como a depressão e ansiedade (Mann, 1999). A serotonina age como um neurotransmissor, sendo liberada na fenda sináptica, onde se liga aos receptores pós-sinápticos. O mecanismo de ação dos antidepressivos da classe dos ISRSs é pautado no bloqueio dos transportadores de serotonina (5HTT) que são responsáveis pelo “recolhimento” da serotonina na fenda sináptica e posterior armazenamento no citoplasma de neurônios pré-sinápticos, um processo comumente referido como recaptação (Fox et al., 2007; Wong et al., 1995). Dessa forma, os ISRSs aumentam a concentração da serotonina extracelular e maximizam a duração do seu estímulo nos neurônios pós-sinápticos.

Diante da sua alta especificidade de ligação para 5HTT, os ISRSs diminuem o potencial de efeitos colaterais indesejados e por isso têm sido o medicamento de primeira escolha para o tratamento de distúrbios não-psiquiátricos (Mojtabai, Olfson,

2011). Em 1988, a Fluoxetina foi o primeiro ISRS aprovado para uso clínico no tratamento de depressão e desde então tem sido um dos medicamentos antidepressivos mais prescritos na prática clínica (Wong et al., 2005). Além disso, diversas pesquisas têm sido conduzidas a fim de explorar as propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras da Fluoxetina, tornando-a o medicamento mais estudado dentre os demais ISRSs (Dionisie et al., 2020).

Dados de diversas pesquisas mostram que a Fluoxetina é capaz de diminuir a inflamação em diferentes modelos animais de depressão. Nestes estudos, vários pesquisadores observaram que o tratamento com Fluoxetina não somente reduziu os níveis plasmáticos de TNF- α , IL-1 β e IL-6, como também reverteu ou preveniu o quadro de depressão induzida em ratos ou camundongos (Lu et al., 2017; Perić et al., 2017). Além disso, foi observado um aumento de IL-10 e IL-4 em modelos animais de estresse crônico imprevisível leve associado a injeção de LPS. Tais evidências sugerem que além de reduzir a inflamação, a Fluoxetina também aumenta a defesa anti-inflamatória na depressão de forma conjunta com um efeito antidepressivo, suportando a hipótese de que o papel antidepressivo da Fluoxetina está diretamente relacionado a sua propriedade anti-inflamatória (Dai et al., 2020; Dionisie et al., 2020; Ghosh et al., 2020; Zhao et al., 2018).

Por outro lado, desde o seu crescente uso no tratamento de distúrbios não psiquiátricos, sendo inclusive prescritos para prevenção de ondas de calor em mulheres na menopausa, diversos estudos clínicos relataram uma associação positiva entre o uso de ISRSs e uma diminuição na densidade mineral óssea e/ou um aumento do risco de fraturas (Haney et al., 2010; Rizzoli et al., 2012; Wu et al., 2009). Desde então levantou-se uma considerável preocupação sobre seu amplo uso, principalmente depois que esta associação foi confirmada através de diversos modelos de roedores (Bliziotis et al., 2002; Bonnet et al., 2007; Warden et al., 2008, 2005). Uma vez que os estudos em animais são capazes de “contornar” os possíveis fatores de confusão das análises clínicas, ou seja, que os ISRSs são prescritos para indivíduos deprimidos e que a depressão é por si só uma possível causa para a perda óssea, estes estudos fortaleceram a ideia de que o tratamento com ISRSs poderia ser um fator de risco independente para o desenvolvimento de osteoporose (Gebara et al., 2014; Haney et al., 2010; Rizzoli et al., 2012). No entanto, embora uma diminuição na formação óssea tenha sido observada, os pesquisadores não

identificaram o mecanismo molecular para esse efeito deletério no tecido ósseo e tampouco definiram uma estratégia terapêutica para prevenir ou tratar esse efeito colateral (Bonnet et al., 2007; Warden et al., 2008, 2005).

Os estudos clínicos que relataram a perda óssea após tratamento com ISRSs examinaram indivíduos que utilizaram esses medicamentos por um período relativamente longo (≥ 1 ano). Portanto, vale ressaltar que nos raros casos em que o uso de ISRSs foi associado a uma densidade óssea aumentada e a uma diminuição nos parâmetros de reabsorção óssea, tais análises foram realizadas após apenas alguns meses de tratamento (Aydin et al., 2011; Misra et al., 2010; Seifert, Wiltout, 2013).

Partindo desta premissa e a fim de explicar este paradoxo envolvendo a administração crônica de ISRSs, Ortuño et al. (2016) demonstraram que os ISRSs afetam a remodelação óssea por meio de dois mecanismos distintos fornecendo uma explicação a nível molecular para os efeitos observados na estrutura óssea. Particularmente, os autores verificaram que a curto prazo (3 semanas), a Fluoxetina possui uma resposta antirreabsortiva local que é inclusive capaz de aumentar a massa óssea. No entanto, o tratamento a longo prazo (6 semanas) compensou o efeito antirreabsortivo inicial e contraditoriamente resultou em uma perda óssea que é por sua vez, mediada por um aumento da atividade simpática desencadeada no sistema nervoso central. Com base nessas descobertas, Ortuño et al. (2016) ainda demonstraram que o co-tratamento de camundongos com Fluoxetina e um β -bloqueador adrenérgico, Propranolol, pode ser uma estratégia terapêutica para neutralizar esse efeito colateral deletério.

A partir desses achados, Lee et al. (2020) realizaram um estudo a fim de verificar se o co-tratamento com Propranolol também teria um efeito positivo sobre o reparo de fratura óssea. Camundongos tratados com Fluoxetina e com fratura de fêmur foram também tratados com Propranolol imediatamente após o momento da fratura, e uma série de análises demonstrou uma reversão do efeito prejudicial da Fluoxetina na cicatrização da fratura em resposta ao tratamento com Propranolol. Os autores concluíram que os efeitos negativos dos ISRSs na consolidação de fraturas podem ser superados por co-tratamento com um bloqueador beta-adrenérgico.

Em 2012, Branco-de-Almeida et al. (2012) investigaram pela primeira vez o impacto do tratamento com Fluoxetina no desenvolvimento da doença periodontal.

Para testar essa hipótese os autores utilizaram um modelo animal de periodontite induzida por ligadura e avaliaram os efeitos da Fluoxetina administrada sistemicamente. Os autores observaram que a Fluoxetina não só modulou positivamente importantes mediadores inflamatórios envolvidos na doença periodontal, como também reduziu a reabsorção óssea alveolar e exerceu um efeito positivo na degradação do colágeno nos tecidos gengivais. Embora a influência positiva da Fluoxetina na reabsorção óssea tenha sido associada a modulação inflamatória local da resposta do hospedeiro envolvendo diversos marcadores inflamatórios, os autores especularam que a maior parte dos efeitos inibitórios da Fluoxetina pode ser atribuída à redução da expressão de IL-1 β , que por sua vez também diminuiu significativamente após a terapia periodontal bem-sucedida, sendo portanto considerado um dos fatores pró-inflamatórios mais importantes (Hou et al., 1995; McCauley, Nohutcu, 2002).

Diante das evidências favoráveis em relação ao uso da Fluoxetina sobre a progressão da doença periodontal, Aguiar et al. (2013) realizaram um estudo a fim de avaliar o efeito da Fluoxetina na doença periodontal em um contexto de estresse induzido por medo condicionado. Neste estudo, também foi demonstrada uma redução na severidade da doença periodontal com o uso da Fluoxetina, mas por outro lado os autores verificaram que a expressão local das citocinas pro-inflamatórias IL-1 β e IL-6 não foram afetadas pelo uso da medicação.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos do estresse crônico na reabsorção óssea periapical em ratos, bem como investigar os efeitos da modulação inflamatória sobre a PA em ratos estressados e tratados com: ISRS, Fluoxetina; bloqueador beta-adrenérgico, Propranolol; e sua associação.

3.2 Específica

Determinar os efeitos do estresse crônico e dos tratamentos com Fluoxetina, Propranolol ou associação de ambos na reabsorção óssea periapical, por meio de:

- a) avaliação da massa corporal;
- b) análise dos níveis séricos de corticosterona por Radioimunoensaio;
- c) análise dos níveis séricos hormonais e inflamatórios por imunoenensaio multiplex;
- e) análise histomorfométrica por coloração com hematoxilina e eosina;
- f) avaliação da estrutura óssea periapical através de microtomografia computadorizada (micro-CT);
- g) análise da expressão gênica de citocinas inflamatórias na região periapical por RT-PCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICT – Unesp sob o protocolo nº 10/2018 (ANEXO A).

4.1 Animais

As estimativas do tamanho da amostra foram baseadas em dados de estudo anterior (Azuma et al., 2017), o tamanho do efeito deste estudo foi estabelecido ($=1,0$). O cálculo amostral indicou o número total de 6 ratos por grupo para obter resultados confiáveis com poder de teste de 95% e nível de significância de 5% para análise estatística. Levando-se em consideração possíveis mortes de animais durante o experimento, dois animais foram adicionados a cada grupo. Para este estudo foram utilizados 40 ratos (machos) (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com aproximadamente setenta dias de idade, pesando entre 300 - 400 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Os animais foram mantidos em gaiolas, à 22°C e alimentados com ração e água *ad libitum*.

4.1.1 Grupos experimentais

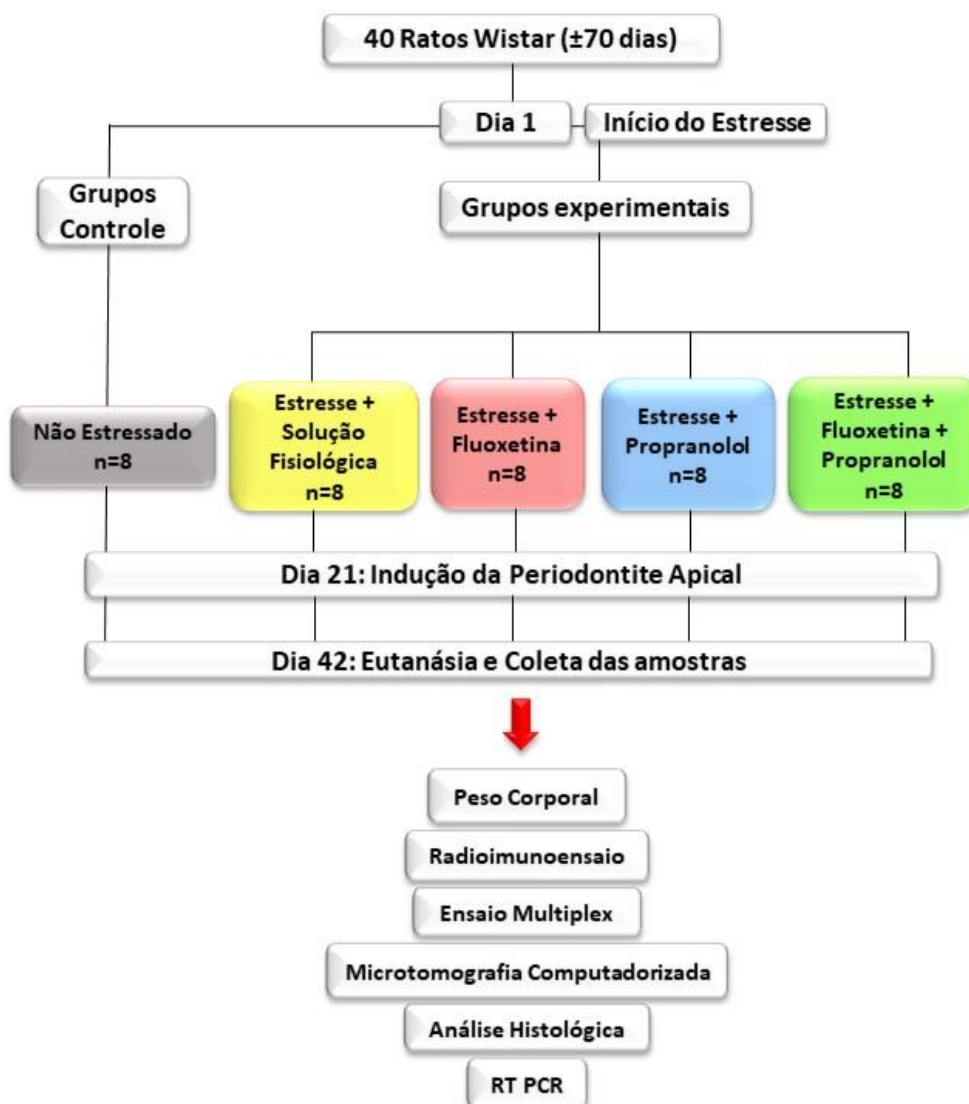
Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (Figura 1):

- a) Grupo controle não-estressado com PA (NS): oito animais que foram submetidos a indução de PA por meio da exposição pulpar dos 4 primeiros molares, superiores e inferiores, esquerdo e direito, e que não receberam nenhum tipo de tratamento;
- b) Grupo estressado com PA e tratado com solução fisiológica (SS): oito

animais que foram submetidos ao protocolo de estresse crônico seguido da indução de PA por meio de exposição pulpar dos 4 primeiros molares, superiores e inferiores, esquerdo e direito, e que receberam administrações diárias de solução fisiológica via oral (0,5 mL) (gavagem);

- c) Grupo estressado com PA e tratado com Fluoxetina (SF): oito animais que foram submetidos ao protocolo de estresse crônico seguido da indução de PA por meio de exposição pulpar dos 4 primeiros molares, superiores e inferiores, esquerdo e direito, e que receberam administrações diárias de Fluoxetina via oral (gavagem, 10 mg/kg/dia) (Habib et al., 2015);
- d) Grupo estressado com PA e tratado com Propranolol (SP): oito animais que foram submetidos ao protocolo de estresse crônico seguido da indução de PA por meio de exposição pulpar dos 4 primeiros molares, superiores e inferiores, esquerdo e direito, e que receberam administrações diárias de propranolol via oral (gavagem, 0,5 mg/kg/dia) (Rodrigues et al., 2012);
- e) Grupo estressado com PA e administração de Fluoxetina e Propranolol (SFP): oito animais que foram submetidos ao protocolo de estresse crônico seguido da indução de PA por meio de exposição pulpar dos 4 primeiros molares, superiores e inferiores, esquerdo e direito, e que receberam administrações diárias de Fluoxetina (10 mg/kg/dia) e Propranolol (0,5 mg/kg/dia) via oral (gavagem).

Figura 1 – Fluxograma do desenho do estudo



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Indução do estresse crônico

O estresse foi realizado conforme protocolo de Willner et al. (1992) com algumas alterações.

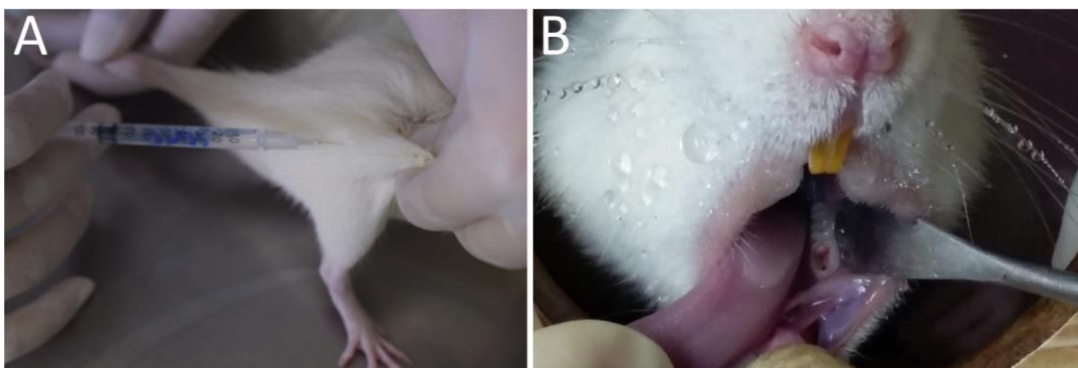
Nos 42 dias de indução de estresse, durante cada uma das seis semanas, ocorreu: dois períodos de privação de alimentos ou água (*overnight*); dois períodos de inclinação da gaiola à 45° (*overnight*); dois períodos de sujidade da gaiola (250 ml de água na serragem) (*overnight*); dois períodos de exposição por luz

estroboscópica (2 horas); dois períodos de aperto caudal (1 min); dois períodos natação em 4°C ou 45°C (3 min); e dois períodos de nenhum stress. Os estressores foram aplicados de forma aleatória no período da manhã (entre 8h e 10h) e a tarde (entre 16h e 18h), exceto pelos estressores que envolviam privação de alimento/água, inclinação e sujidade da gaiola que eram aplicados *overnight*. Durante todos os dias do protocolo de estresse, os animais receberam a medicação respectiva de cada grupo que foram administradas oralmente via gavagem.

4.3 Indução da Periodontite Apical

Os procedimentos de indução da lesão periapical foram realizados com assepsia, utilizando álcool 70%, e instrumentais devidamente esterilizados. O cirurgião e auxiliares utilizaram equipamentos de proteção individual. Para anestesia geral, foi utilizada solução de ketamina (75 mg/kg, Dopalen; Ceva Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brasil) e xilazina (50 mg/kg, Anasedan; Ceva Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brasil), via injeção intramuscular. Para a indução da lesão periapical, as polpas dentais dos primeiros molares superiores e inferiores esquerdos e direitos, foram expostas através de abertura na fossa distal, na face oclusal com brocas esféricas em alta rotação #1011 HL (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil), na profundidade do diâmetro da broca - 1mm, tomando o devido cuidado para não perfurar a furca (Cintra et al., 2016). Em seguida, uma lima K #10, (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland), foi utilizada para remoção do remanescente pulpar a fim de prevenir sintomatologia dolorosa no período pós-operatório (Figura 2). Os procedimentos para indução da lesão periapical foram realizados no 21º dia após o início do protocolo de estresse crônico (Minhoto et al., 2021). As cavidades ficaram expostas ao meio bucal por período total de 21 dias com objetivo de induzir a contaminação bacteriana e consequente lesão periapical inflamatória (Minhoto et al., 2021).

Figura 2 – Indução da PA



Legenda: a) injeção anestésica intramuscular; b) exposição pulpar do primeiro molar realizada com broca esférica.

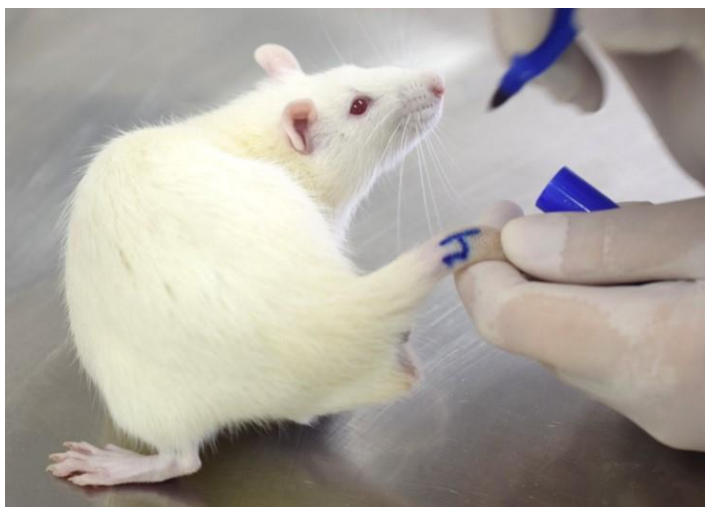
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Massa corporal dos animais

Todos os animais foram identificados (Figura 3) e pesados no primeiro dia do experimento, no dia da indução da PA e no dia da eutanásia. Cada animal foi pesado em balança digital e o percentual de alteração do peso de cada um dos animais foi calculado conforme a fórmula (Martins et al., 2017):

$$\text{Ganho de massa (\%)} = \frac{(\text{Massa corporal final} - \text{Massa corporal inicial}) \times 100}{\text{Peso Inicial}}$$

Figura 3 – Identificação dos animais



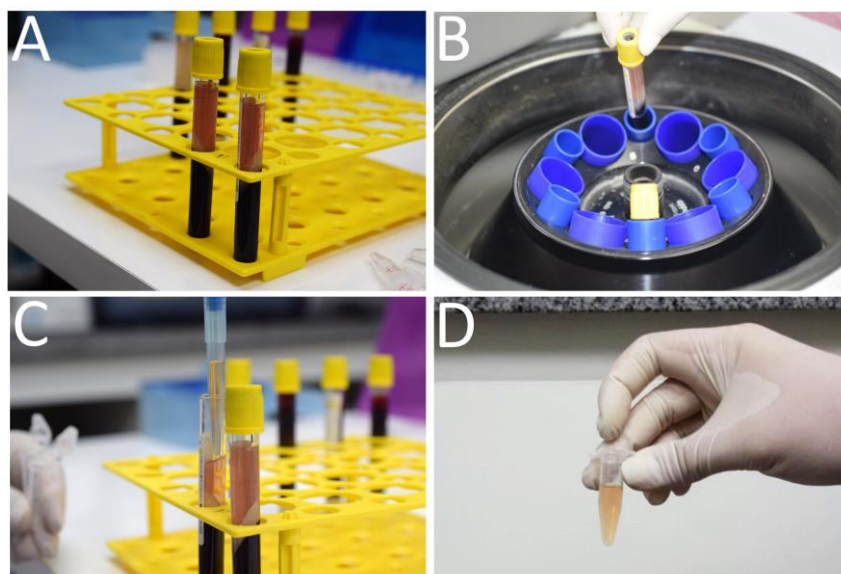
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Eutanásia e coleta das amostras

Os animais foram anestesiados com ketamina (75 mg/kg, Vetaset; Fort Dodge Animal Health Ltd, São Paulo, Brasil) e xilazina (50 mg/kg, Coopazine; Coopers Ltd Brasil, São Paulo, Brasil) por injeção via intramuscular e eutanasiados no 42º dia do experimento, ao final do protocolo de estresse (Minhoto et al., 2021).

No dia da eutanásia foram coletados 5mL de sangue por punção intracardíaca em tubos para coleta à vácuo contendo gel separador de soro (Labor Import, Osasco, SP – Brasil). Posteriormente, o sangue foi mantido em repouso por 30 min em temperatura ambiente e após esse período os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 5 min para obtenção do soro. Com auxílio de uma micropipeta, foi coletado 1 mL de soro de cada amostra, que foram colocados em microtubos tipo eppendorf previamente identificados, sendo posteriormente armazenados a -20°C até o momento das dosagens das concentrações séricas de corticosterona por RIA (Khoury et al., 2020) (Figura 4).

Figura 4 – Processamento técnico para obtenção do soro sanguíneo

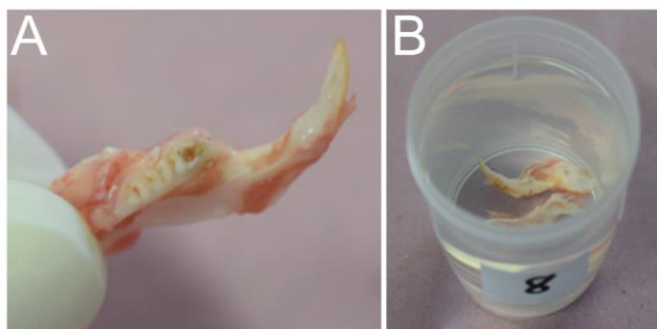


Legenda: a) após a coleta o tubo foi mantido em temperatura ambiente, em repouso até total retração do coágulo; b) o tubo é centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos para obtenção do soro; c) coleta de 1mL de amostra sorológica com auxílio de micropipeta; d) amostra de soro obtida em tubo eppendorf para ser encaminhado para o teste de RIA.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a realização da coleta sanguínea, os animais foram submetidos a eutanásia por superdosagem anestésica seguida de decapitação. As mandíbulas e maxilas, do lado direito e esquerdo dos animais (n=8), foram removidas, dissecadas e fixadas em solução de paraformaldeído à 4% durante 48 horas (Azuma et al., 2017) (Figura 5). As peças foram então encaminhadas para escaneamento microtomográfico. Após o escaneamento microtomográfico, as mandíbulas foram submetidas ao protocolo de descalcificação em solução de EDTA 10% por um período de 6 a 8 semanas, e depois de desidratadas foram embebidas em blocos de parafina (Prieto et al., 2017).

Figura 5 – Dissecção das amostras



Legenda: a) mandíbula esquerda após a dissecção; b) armazenamento da peça em pote coletor com solução de paraformaldeído à 4%.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a desmineralização das amostras, cortes com espessuras de 5 μm foram preparados, permitindo uma secção do primeiro molar inferior esquerdo no seu eixo longitudinal. Os cortes obtidos foram submetidos a técnica histológica de coloração hematoxilina-eosina.

O osso circundante da lesão periapical dos primeiros molares superiores do lado esquerdo e direito, foi coletado para quantificação da expressão gênica de citocinas inflamatórias e biomarcadores de reabsorção óssea por transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) (Howait et al., 2019; Matsui et al., 2011; Shadmehr, Khademi, 2013) As peças foram mantidas em solução RNA later (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) e foram devidamente armazenadas e congeladas à -80°C até o momento do processamento do tecido (Shadmehr, Khademi, 2013).

4.6 Análise dos níveis séricos de corticosterona por Radioimunoensaio

Amostras de sangue foram colhidas entre o período de 8:00h e 10:00h no dia da eutanásia. O soro foi obtido e armazenado à -20°C . Posteriormente, as amostras sorológicas foram armazenadas e enviadas ao Laboratório de Endocrinologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (UNESP) para dosagem hormonal de corticosterona através da técnica de radioimunoensaio.

O kit de corticosterona (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) para ratos e camundongos foi utilizado para determinar os níveis de corticosterona no soro cada animal a partir de uma curva padrão e expresso em ng/ml (Khoury et al., 2020). Todas as amostras foram dosadas em duplicata e o valor médio das amostras foi considerado para análise estatística. Para avaliar o controle de qualidade interno (variação intra-ensaio) dos testes, o coeficiente de variação (CV%) foi calculado entre as duplicatas (Bekhbat et al., 2018).

4.7 Análise dos níveis séricos hormonais e inflamatórios por ensaio multiplex

A dosagem do conteúdo de Hormônios (ACTH, Melatonina e Corticosterona) e Citocinas (IL-10, IL-1 β , IL-6, TNF- α) foi realizada por imunoensaio com microesferas do tipo Multiplex utilizando os kits MILLIPLEX® MAP Rat Stress Hormone Magnetic Bead Panel Kit (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) e MILLIPLEX® MAP Rat Expanded Cytokine Magnetic Kit Panel, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante (Brandish et al., 2014; García-Iglesias et al., 2013).

Cada conjunto de microesferas, utilizadas na detecção dos respectivos hormônios e respectivas citocinas, foi marcado com uma coloração específica obtida pela combinação de dois fluoróforos. As microesferas foram revestidas por anticorpos monoclonais específicos que se associam aos hormônios alvos presentes nas amostras. Após a incubação das amostras com as microesferas, adicionou-se uma mistura de anticorpos biotinilados que se ligam aos hormônios dos animais. Os anticorpos biotinilados foram então detectados pelo conjugado ficoeritrina-estreptavidina.

O ensaio foi realizado na Universidade do Vale do Paraíba (Univap) utilizando o sistema Luminex MAGPIX® (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) de detecção de fluorescência que empregou dois lasers: o primeiro feixe excita as microesferas, classificando-as pela coloração; o segundo feixe quantifica a fluorescência emitida pelas moléculas de ficoeritrina associadas a cada microesfera. A concentração de hormônios e citocinas nas amostras foram estimadas a partir de

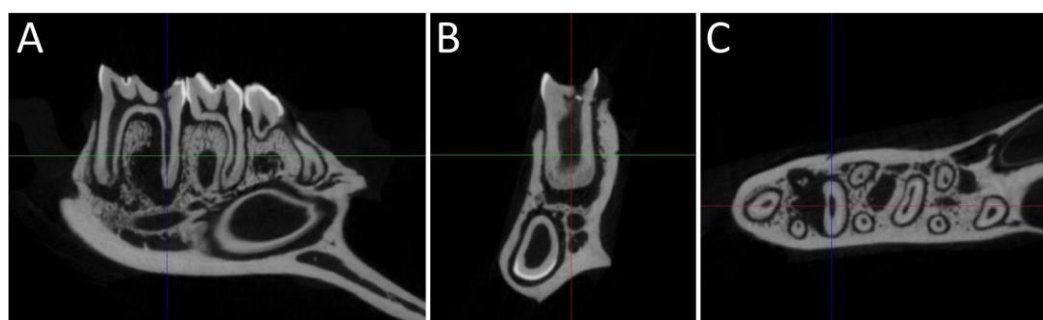
curvas padrão construídas com o auxílio do software xPONENT 4.1 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

4.8 Análise da estrutura óssea periapical por micro-CT

Para realização da análise microtomográfica foi utilizado um aparelho modelo 1176 da fabricante SkyScan® (SkyScan 1176 *in vivo*, Skyscan, Kontich, Belgium). Após a fixação, 08 hemi-mandíbulas esquerdas de cada grupo experimental foram preparadas para escaneamento microtomográfico. As peças foram posicionadas e fixadas no porta-amostra apropriado para o equipamento, presas no meio de um isopor cilíndrico bipartido envoltas por papel absorvente úmido, possibilitando a estabilização a fim de prevenir qualquer tipo de movimentação durante o escaneamento e mantendo a umidade da peça.

O escaneamento das amostras foi padronizado com um tamanho de voxel isotrópico de 18µm, 50 kV, 500 µA, em 180°, ângulo de rotação de 0,0120 e filtro de alumínio de 0,5 mm de espessura com tempo de exposição de 380 milissegundos. As imagens foram reconstruídas utilizando o software NRecon® (v 1.6.3.3, Bruker) utilizando os seguintes parâmetros: 4 de *ring artefact correction*, 40% de *beam hardening correction* e 2 de *smoothing* para todas as imagens (Pinto et al., 2020b). O programa DataViewer® foi utilizado para visualização e avaliação em 2D (medidas lineares) dos eixos sagital, coronal e axial (Figura 6).

Figura 6 – Imagem do programa DataViewer® utilizada para visualização da orientação padrão da imagem em três planos



Legenda: a) plano sagital; b) plano coronal; c) plano axial
 Fonte: Elaborada pelo autor.

O processamento e a análise das imagens foram realizados com o programa CTAn® (v1.6.6.0, Bruker), em corte sagital (Wan et al., 2014; Yang et al., 2014). O objetivo das análises volumétricas (3D) foi quantificar o volume da reabsorção óssea na região do periápice em mm^3 . Para permitir o reconhecimento da lesão periapical, as imagens foram rotuladas de acordo com os valores de cinza das estruturas (Pinto et al., 2020b). A escala de cinza foi determinada em um histograma de densidade usado para obter uma imagem imposta apenas de pixels preto / branco (Pinto et al., 2020b). Comparações entre a varredura original e segmentada foram realizadas para garantir a precisão da segmentação. Em relação à segmentação, um histograma de densidade entre 0 e 60 foi utilizado para selecionar a lesão periapical (Pinto et al., 2020b). A seleção manual da região de interesse (ROI) a ser avaliada foi feita em todos os conjuntos de imagens e o ROI personalizado foi escolhido a fim de permitir um delineamento manual da lesão periapical, fornecendo um tamanho mais preciso do volume de reabsorção óssea (Kalatzis-Sousa et al., 2017) (Figura 7). Para tanto, foi escolhido como ponto central, o corte (*slice*) onde a lesão periapical aparecia em sua maior extensão. As imagens correspondentes aos pontos finais da seleção (*top* e *bottom*) foram determinados no sentido vestibulo-lingual e linguo-vestibular, respectivamente, a partir do ponto central. Todos os delineamentos foram realizados por um examinador calibrado que não tinha nenhuma informação em relação à identificação dos grupos avaliados e os cálculos foram realizados sobre a região de interesse selecionada. A área da lesão, o volume total selecionado

(TV), o volume da lesão (BV), bem como a sua razão (BV/TV), foram quantificados automaticamente pelo software CTAn® (v1.6.6.0, Bruker).

Figura 7 – Representação ilustrativa do ROI personalizado delineado manualmente circundando a lesão periapical com margem de segurança no eixo sagital



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.9 Análise histológica

Após desmineralização, as hemi-mandíbulas esquerdas foram lavadas abundantemente em água corrente e submetidas à técnica histológica de rotina para inclusão em parafina. A orientação no momento da inclusão permitiu a realização de cortes teciduais dos primeiros molares inferiores e estruturas de suporte no sentido longitudinal. Após a inclusão, as peças foram cortadas de forma semi-seriada, com 5 μ m de espessura, realizados em micrômetro (Leica - RM 2045). Os cortes microscópicos montados em lâminas de vidro foram então submetidos a coloração com hematoxilina e eosina. Imagens das lâminas foram obtidas em aumento de 10, 40 e 100 x, utilizando microscópio óptico Axioscope 40.

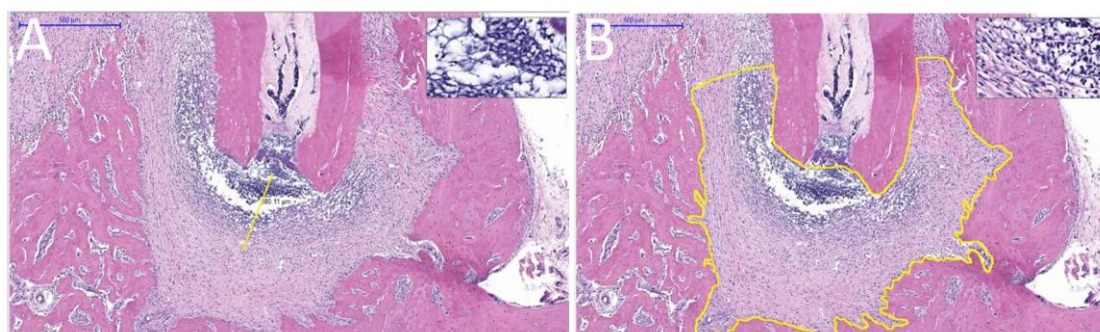
A análise microscópica foi realizada de forma descritiva e quantitativa em cortes teciduais representativos de cada grupo. As imagens foram avaliadas quanto a intensidade e extensão do infiltrado inflamatório e área de reabsorção óssea periapical. As análises de extensão do infiltrado e área de reabsorção foram mensuradas por um examinador calibrado utilizando o programa Image J®.

O infiltrado inflamatório foi avaliado quanto à intensidade e extensão.

Para cada grupo experimental, o número de células inflamatórias foi calculado como a média aproximada de células inflamatórias presente em 10 diferentes áreas de um mesmo espécime examinados ao redor ápice dentário (ampliação x40). A intensidade do infiltrado inflamatório foi classificada como ausente (0 a poucas células inflamatórias: score 1), leve (< 25 células: score 2), moderada (25 a 125 células: score 3) e severa (> 125 células: score 4) (Azuma et al., 2017).

A extensão do infiltrado inflamatório foi mensurada traçando uma linha reta partir do ápice radicular e se estendendo até o limite do infiltrado como demonstrado na Figura 8A. Para a quantificação da reabsorção óssea associada ao terço apical da raiz distal do primeiro molar a área da lesão periapical foi calculada através do delineamento manual do limite da lesão, considerando a superfície exterior externa do cimento, o ligamento periodontal e a superfície externa do osso alveolar, e foi expressa em μm^2 . A medição foi realizada em 4 seções equidistantes para o canal radicular, e apenas a maior área foi selecionada (Samuel et al., 2019) (Figura 8B). Os dados numéricos obtidos foram tratados estatisticamente averiguando-se a existência ou não de diferença na severidade das lesões periapicais entre os grupos.

Figura 8 – Imagens representativas da análise histomorfométrica da lesão periapical



Legenda: a) traçado para mensuração da extensão do infiltrado inflamatório; b) delineamento manual da área de reabsorção óssea a partir do terço apical.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.10 Análise da expressão gênica de citocinas inflamatórias na lesão periapical por RT-PCR

Amostras de tecido ósseo da região periapical foram coletados no dia da eutanásia e armazenados em solução de RNA later (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) à -80°C até o momento do processamento do tecido (Shadmehr, Khademi, 2013).

A localização, função e referência dos iniciadores para os genes utilizados neste trabalho, estão descritos no Quadro 1. A sequência nucleotídica, especificidade e temperatura de melting (T_m) de cada iniciador foram confirmadas no programa BLAST e PRIMER BLAST/ NCBI/ GENE BANK (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

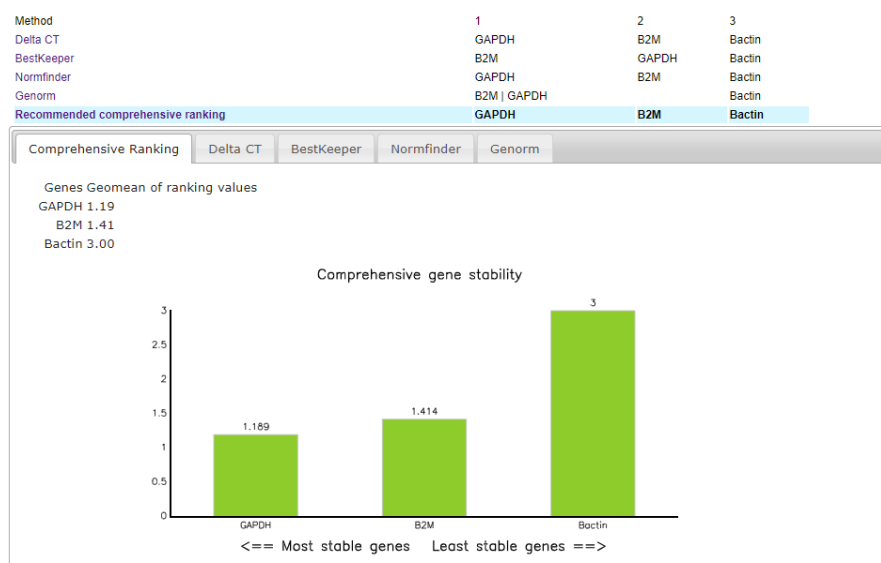
Quadro 1 – Primers forward e reverse utilizados no RT-PCR

GAPDH (Gapdh)	GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG	61.37	197	NM_017008.4
	GTGGTGACAGGATGCATTGCTGA	63.98		
β -Actina (Actb)	ATCGCTGACAGGATGCAGAA	53.92	106	NM_031144.3
	TAGAGCCACCAATCCACACAG	59.72		
B2M (B2m)	TGCCATTCAGAAACTCCCC	58.08	73	NM_012512.2
	GAGGAAGTTGGGCTTCCCATT	60.27		
RANKL (Tnfsf11)	GTACTTTCGAGCGCAGATGG	59.08	125	NM_057149.1
	CTGTGTCTTCGCTCTCCAGA	59.12		
OPG (Tnfrsf11b)	ACACACCAACTGCAGCTCAC	61.10	191	NM_012870.2
	TGTCCACCAGAACACTCAGC	59.89		
TRAP (Acp5)	CGGGAGAGATTGGTGATGGA	58.88	81	NM_001270889.1
	TGTACAGTGAGCCAGGAGTG	59.03		
IL-6 (Il-6)	AGCCAGAGTCATTCAGAGCA	58.73	105	NM_012589.2
	AGAGCATTGGAAGTTGGGGT	59.22		
IL-10 (Il-10)	CTGCTCTTACTGGCTGGAGT	59.10	75	NM_012854.2
	TGGGAAGTGGGTGCAGTTAT	58.93		
IL-17 (Il17a)	ACTTCCGGGTGGAGAAGAT	58.34	101	NM_001106897.1
	CTTAGGGGCTAGCCTCAGGT	60.40		
MMP-8 (Mmp8)	GATTCAGAAGAAACGTGGACTCAA	59.25	109	NM_022221.1
	CACCAGGATCAGTGGAGTGAGA	61.15		
MMP-13 (Mmp13)	ACCCAGCCCTATCCCTTGAT	60.03	178	NM_133530.1
	TCTCGGGATGGATGCTCGTA	60.18		

Fonte: Elaborada pelo autor.

No nosso trabalho foram testados três genes de referência, Gapdh, β -Actina, e B2m em todos os grupos experimentais. Os resultados obtidos foram analisados no site <http://www.leonxie.com/referencegene.phpe>, que avalia por quatro métodos diferentes (Delta CT, BestKeeper, NormFinder e Genorm, e o gene de referência escolhido foi Gapdh (Figura 9).

Figura 9 – Imagem extraída do website para a seleção de controle endógeno



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.10.1 Extração de RNA

Para extração de RNA, as amostras de tecido ósseo foram maceradas e pulverizadas através de moagem sob baixa temperatura utilizando cadinho e nitrogênio líquido. A extração de RNA do tecido pulverizado foi realizada utilizando solução de Trizol (Ambion, Inc, AM1926, Waltham, MA, EUA). Posteriormente, a amostra triturada foi coletada com 1 mL do reagente Trizol (AMBION, Inc, AM1926, USA) e com uma pipeta de 1000 µL, lavou-se todo o fundo do cadinho, removendo completamente todo tecido ósseo da superfície (Howait et al., 2019; Matsui et al., 2011). O Trizol (AMBION, Inc, AM1926, USA) é composto por uma solução monofásica contendo fenol, isotiocianato de guanidina e outros componentes que permitirão o isolamento de uma vasta variedade de RNAs. O conteúdo contendo o Trizol e a amostra foi adicionado a um microtubo de 2,0 mL, e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos. Após este procedimento, 200 µL de Clorofórmio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram adicionados e novamente incubado à temperatura ambiente por mais 3 minutos. Transcorrido o tempo, os tubos contendo as soluções de Trizol e amostra foram centrifugados à 4°C, numa

rotação de 12,000 x g por 15 minutos em uma microcentrífuga refrigerada (EPPENDORF 5430, Alemanha). Nesta etapa ocorreu a separação entre a fase aquosa translúcida e a fase orgânica rosa. Então, a fase aquosa sobrenadante foi, cuidadosamente, transferida para um novo microtubo de 1,5mL, onde adicionou-se 500 µL de Isopropanol puro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para a precipitação do RNA. Posteriormente, o tubo foi submetido a uma centrifugação de 12,000 x g por 15 minutos, a 4°C, para visualização do sedimento (pellet) de RNA. O sedimento obtido foi lavado com etanol a 70% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), diluído em água Depec) para remoção completa do isopropanol. Novamente, o tubo foi centrifugado a 12,000 x g por 15 minutos, a 4°C. Para a eluição, foi utilizado 25 µL da solução RNA Storage buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Após a eluição, as amostras foram acondicionadas no gelo e quantificadas na concentração de ng/µL pelo espectrofotômetro Nanodrop® 2000c UV- Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A quantidade obtida e a pureza de todas as amostras (relação 260/280 nm) foram maiores que 1,80, e satisfatória para o processo de transcrição reversa (Bustin et al., 2009). Após a dosagem os tubos foram armazenados em freezer a -80°C.

O RNA total extraído foi tratado com DNase I, Amplification Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para que o DNA contaminante fosse removido, evitando assim, um aumento superestimado da expressão gênica (Howait et al., 2019; Matsui et al., 2011).

4.10.2 Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR)

O RNA total após o tratamento com DNase foi transcrito para cDNA utilizando o Kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

Para a transcrição reversa foi adicionado em um microtubo de 200 µL os seguintes reagentes: Enzima mix (contendo Rnase Out e Superscript III), Reaction mix (oligo (dT)20 (2,5 µM), random hexamers (2,5 ng/µL), 10 mM MgCl₂ e dNTPs), solução de RNA e água Depec para um volume final de 20 µL. Esta mistura foi

incubada em termociclador (Mastercycler-Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com o ciclo de: 10 minutos a 25°C, 50°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos. Transcorrido esse ciclo, os tubos foram colocados no gelo e foi adicionado 1 µL de RNase H e incubados por mais 20 minutos a 37°C. O novo cDNA obtido foi armazenado a -20°C.

4.10.3 PCR em Tempo Real (qPCR)

4.10.3.1 Análise da eficiência da reação de PCR em Tempo Real

A eficiência (E) da amplificação da PCR é a taxa na qual um amplicon, produto pós-PCR, é gerado e seus valores expressos em porcentagem. Se um amplicon dobrar em quantidade durante a fase geométrica da amplificação da PCR, então a reação apresentará 100% de eficiência (<http://www.lifetechnologies.com>). Esta deve variar idealmente entre os 90% e 100% ($-3.6 > slope > -3.1$), podendo ser determinada através de métodos diversos (Bustin et al., 2009). O mais simples baseia-se na equação (<http://www.lifetechnologies.com>).

$$E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100.$$

O *slope* de uma curva padrão é comumente utilizado para estimar a eficiência de amplificação de uma reação de PCR em tempo real. A estimativa precisa da eficiência da PCR depende de uma série de fatores tais como os reagentes, concentração de *primers* e qualidade e quantidade da amostra (<http://www.lifetechnologies.com>). A curva de dissociação dos *primers* testados indicou apenas um pico mostrando a sua especificidade. O ideal é obter uma menor concentração de *primers* que gere uma máxima amplificação. Para validação cada *primer* foi feita uma curva padrão afim de calcular a sua eficiência de amplificação.

4.10.3.2 Reação de PCR

Os cDNAs transcritos foram amplificados para a quantificação relativa da expressão dos genes *Tnfsf11*, *Tnfrsf11b*, *Acp5*, *Il-6*, *Il-10*, *Il17a*, *Mmp8* e *Mmp13*. A expressão genética é apresentada como o ratio da concentração dos genes alvo, descritos acima, em relação à concentração do gene de referência (*Gapdh*) e representam a expressão média obtida de reações distintas de PCR em Tempo Real.

O Ct (*Threshold Cycle*) é o ponto correspondente ao número de ciclos a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do gene alvo avaliado. As médias dos valores de Ct, medidas em triplicata, foram utilizadas para calcular a expressão dos genes alvos (*Tnfsf11*, *Tnfrsf11b*, *Acp5*, *Il-6*, *Il-10*, *Il17a*, *Mmp8* e *Mmp13*), com normalização a um controle interno (*Gapdh*). Os resultados foram obtidos como valores relativos da expressão gênica com base na fórmula

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

em comparação a um alvo-interno de referência, previamente selecionado, e que resultou em valor igual 1 (Livak, Schmittgen, 2001).

O método qPCR avaliou a quantidade do produto cDNA na fase exponencial da reação de amplificação. Para o sistema de detecção, foi utilizado o fluoróforo SYBR® Green (Kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG – Invitrogen, EUA) que consistiu na seguinte reação: em um microtubo de 200 µL, foi colocado 12,5 µL de Super mix Platinum SYBR Green, 1 µL de ROX (corante de referência), 300 nM de *primer forward*, 300 nM de *primer reverse*, 3,4 µL solução de cDNA (diluída 1:5) e 2,1 µL água Depec (Invitrogen, EUA) para o volume final de 20 µL. Os microtubos foram incubados no aparelho StepOnePlus™ System (Applied Biosystem, EUA) com os seguintes ciclos: 50°C por 2 minutos, seguido de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos e mais 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos. Após o término do último ciclo, as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação (Melt), conferindo-se a ausência de qualquer curva bimodal ou sinal anormal de amplificação, analisadas a cada 0,1°C.

A detecção da fluorescência, no fim da etapa de cada ciclo da PCR, permitiu a monitoração da quantidade crescente de cDNA amplificado, sendo os dados obtidos analisados no Software do equipamento de real-time.

4.11 Análise estatística

Para a escolha do teste estatístico adequado, todos os dados foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, aderência Lilliefors. Estabeleceu-se o nível de significância de 5% para todos os testes. Para realização das análises, foi utilizado o programa GraphPad Prism Versão 5.00 Portable for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

Cada um dos parâmetros de avaliação incluídos neste estudo foi estatisticamente analisado em duas partes:

1) Avaliação da influência do estresse crônico na PA: nesta primeira análise os grupos NS e SS foram comparados entre si utilizando um experimento fatorial do tipo 1x2, no qual se analisou uma variável independente: Estresse, apresentando duas categorias: ausência (NS) ou presença (SS). As unidades experimentais (ratos) foram distribuídas aleatoriamente para as duas condições experimentais, com oito réplicas cada, totalizando dezesseis dados. Os dados paramétricos obtidos dos grupos NS e SS foram submetidos ao teste T de *Student*, enquanto os dados não paramétricos foram analisados pelo teste Mann-Whitney.

2) Avaliação do efeito do tratamento com Fluoxetina, Propranolol e sua associação no desenvolvimento da PA em ratos submetidos ao estresse crônico: nesta segunda análise foram comparados apenas os grupos estressados. Desta maneira, foi realizado um experimento fatorial do tipo 1x4, no qual existe uma variável independente: medicamento, que apresenta 4 categorias: solução fisiológica/controle (SS), Fluoxetina (SF), Propranolol (SP), Fluoxetina e Propranolol (SFP). As unidades experimentais (ratos) foram distribuídas aleatoriamente para as quatro condições experimentais, com oito réplicas cada, totalizando trinta e dois ratos. Os testes estatísticos utilizados nesta parte foram análise de variância –

ANOVA para dados paramétricos ou Kruskal-Wallis para os dados não paramétricos, e quando necessário, aplicou-se os testes pos-hoc de Tukey e Dunn, respectivamente, para comparações múltiplas.

5 RESULTADOS

5.1 Massa corporal

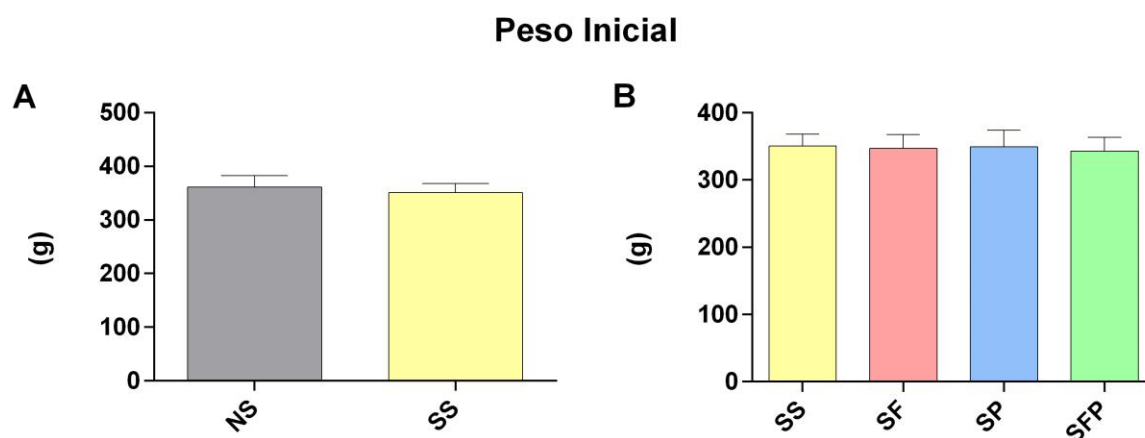
A estatística descritiva referente aos dados obtidos em relação a massa corporal dos animais está representada na Tabela 1. No início do experimento, os animais de todos os grupos apresentaram massa corporal semelhante sem diferença estatística nas duas comparações, entre os grupos controles NS e SS ($p = 0,27$) e entre os grupos experimentais ($p = 0,89$) (Figura 10AB). Ao final do experimento, verificou-se uma diferença estatística significativa entre os grupos controle NS e SS em relação a massa corporal média final ($p = 0,0004$) (Figura 11A). No entanto, nenhuma diferença estatística significativa foi observada em relação a massa corporal média final entre os grupos de animais estressados ($p = 0,06$) (Figura 11B).

Tabela 1 – Valores de massa corporal dos animais no início (g), ao final do experimento (g) e ganho de massa corporal (%) representados pela média e desvio padrão (DP) de cada grupo

Grupos		Peso Inicial (g)	Peso final (g)	Alteração de Peso (%)
NS		361,3 ± 21,51	418,80 ± 15,29	16,11 ± 4,72
SS		350,6 ± 17,61	377,1 ± 18,68	6,66 ± 1,57
SF	Média ± DP	346,9 ± 20,69	352,1 ± 6,98	0,57 ± 3,71
SP		349,4 ± 24,56	384,4 ± 39,86	9,82 ± 4,81
SFP		343,1 ± 19,99	354,2 ± 24,58	0,39 ± 4,41

Fonte: Elaborada pelo autor.

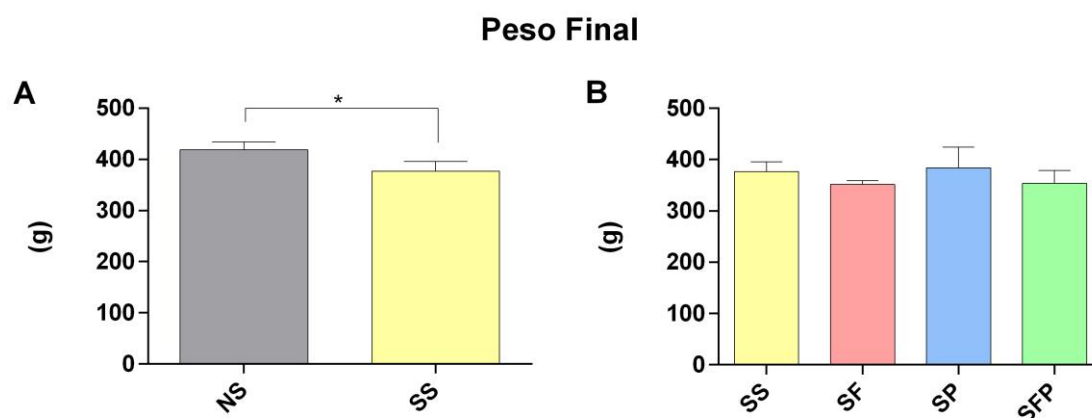
Figura 10 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores de massa corporal dos animais no início do experimento



Legenda: a) comparação entre os grupos controle (variável independente: estresse); b) comparação entre os grupos estressados (variável independente: medicamento).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 11 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores de massa corporal dos animais ao final do experimento



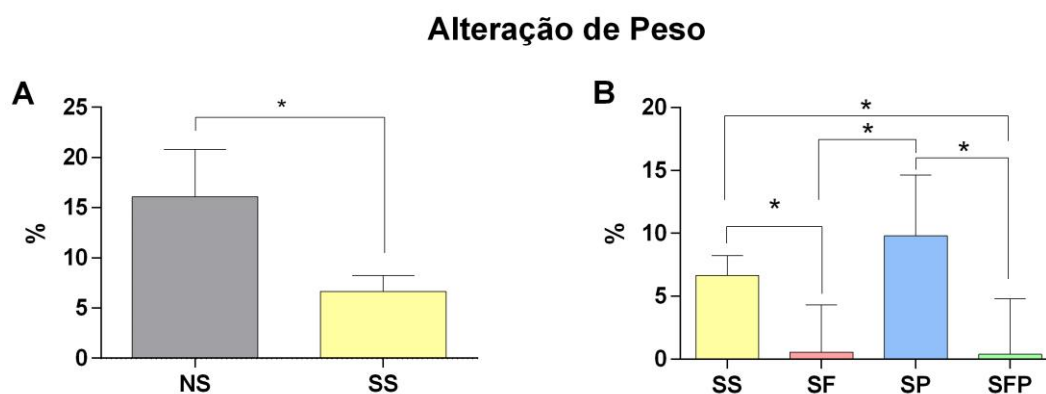
Legenda: a) comparação entre os grupos controle (variável independente: estresse); b) comparação entre os grupos estressados (variável independente: medicamento).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O ganho de massa corporal dos animais ao longo do experimento foi tomado como um dos parâmetros indicativos de estresse. Após a aplicação da fórmula para verificação do percentual de alteração da massa corporal, foi observada uma

diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle NS e SS ($p = 0,0002$) (Figura 12A) e entre os grupos estressados, uma vez que os grupos SF e SFP apresentaram um percentual de ganho de massa significativamente menor comparado aos demais grupos estressados ($p = 0,0003$) (Figura 12B). Na Figura 13 podemos observar de forma ilustrativa a evolução do ganho de massa corporal dos animais ao longo de todo o experimento.

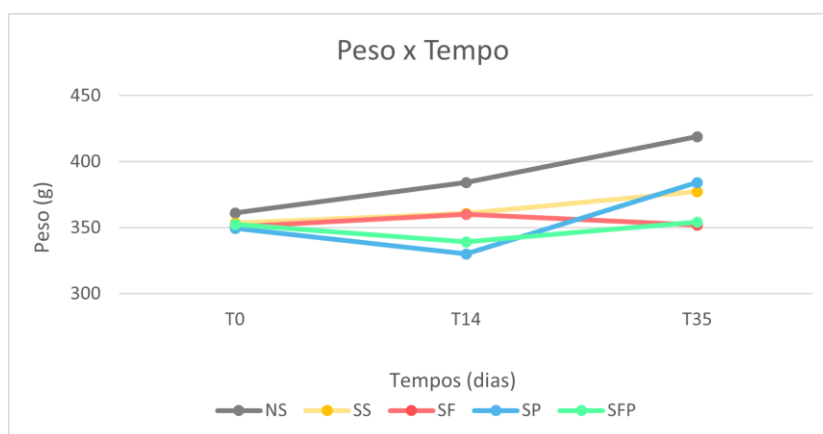
Figura 12 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores de ganho de massa corporal dos animais durante o experimento



Legenda: a) comparação entre os grupos controle (variável independente: estresse); b) comparação entre os grupos estressados (variável independente: medicamento).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 13 – Representação gráfica da evolução do ganho de massa corporal dos animais ao longo do experimento



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Níveis séricos de corticosterona por RIA

Todas as amostras submetidas ao teste de RIA foram avaliadas em duplicata e o valor médio das amostras foi considerado para análise estatística. O controle de qualidade dos ensaios foi baseado na análise dos coeficientes de variação intra-ensaio que ficaram dentro do padrão esperado de até 15% e confirmaram a qualidade dos ensaios realizados. O limite inferior de sensibilidade foi 2,38 ng/mL e os coeficientes de variação intra-ensaio alto e baixo foram 9,92% e 1,31%, respectivamente.

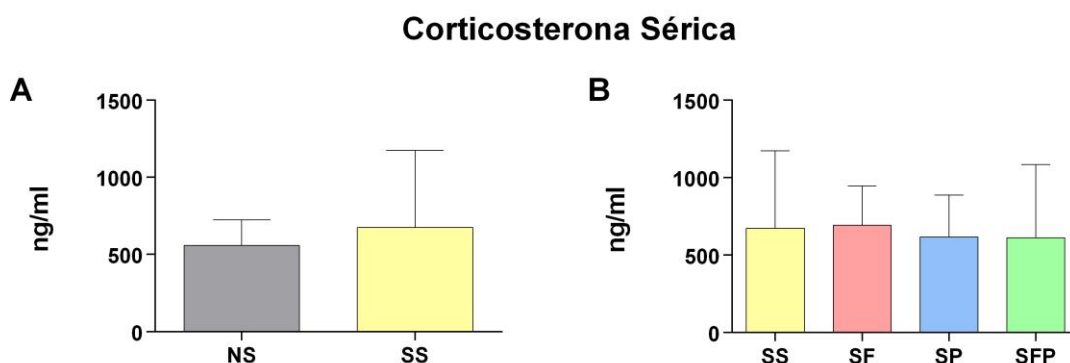
A estatística descritiva dos dados obtidos pelo RIA referente aos níveis de corticosterona sérica avaliados no último dia de experimento estão representados na Tabela 2. A análise estatística inferencial dos dados mostrou não haver diferença estatística significativa entre os grupos em relação ao nível de corticosterona sérica dos animais, em ambas as comparações entre grupos controle e experimentais ($p > 0,99$; $p = 0,78$, respectivamente) (Figura 14).

Tabela 2 – Valores do nível de corticosterona sérica (ng/ml) analisados por RIA representados pela média e desvio padrão (DP) de cada grupo

Grupos		Corticosterona Sérica (ng/mL)
NS		557,6 ± 166,6
SS		674,1 ± 499,5
SF	Média ± DP	692,6 ± 252,6
SP		617 ± 271
SFP		613,1 ± 471

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores de corticosterona sérica (ng/ml) dos animais



Legenda: a) comparação entre os grupos controle (variável independente: estresse); b) comparação entre os grupos estressados (variável independente: medicamento).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Níveis séricos hormonais e inflamatórios por ensaio Multiplex

A estatística descritiva dos valores obtidos pelo ensaio Multiplex referentes aos hormônios biomarcadores de estresse está representada na Tabela 3.

Na análise estatística inferencial dos dados, os níveis séricos de ACTH nos animais do grupo estressado SS foram significativamente mais altos em relação aos níveis séricos de ACTH observados no grupo NS ($p = 0,021$) (Figura 15A). Na análise estatística entre os grupos estressados, o grupo SP apresentou níveis séricos de ACTH mais baixos com diferença estatística significativa em relação ao grupo SS ($p = 0,03$) (Figura 15B).

A análise dos valores de corticosterona sérica obtidos pelo ensaio Multiplex não indicaram diferença entre os grupos NS e SS ($p = 0,79$) (Figura 15C). No entanto, a comparação entre os grupos estressados mostrou uma diferença significativa entre os grupos SF e SFP ($p = 0,012$) (Figura 15D).

Em relação a análise dos valores de melatonina sérica não houve diferença estatística significativa entre os grupos NS e SS ($p = 0,97$) (Figura 15E). No entanto, a análise estatística entre os grupos estressados revelou níveis de melatonina sérica significativamente mais altos no grupo SP que foram estatisticamente diferentes

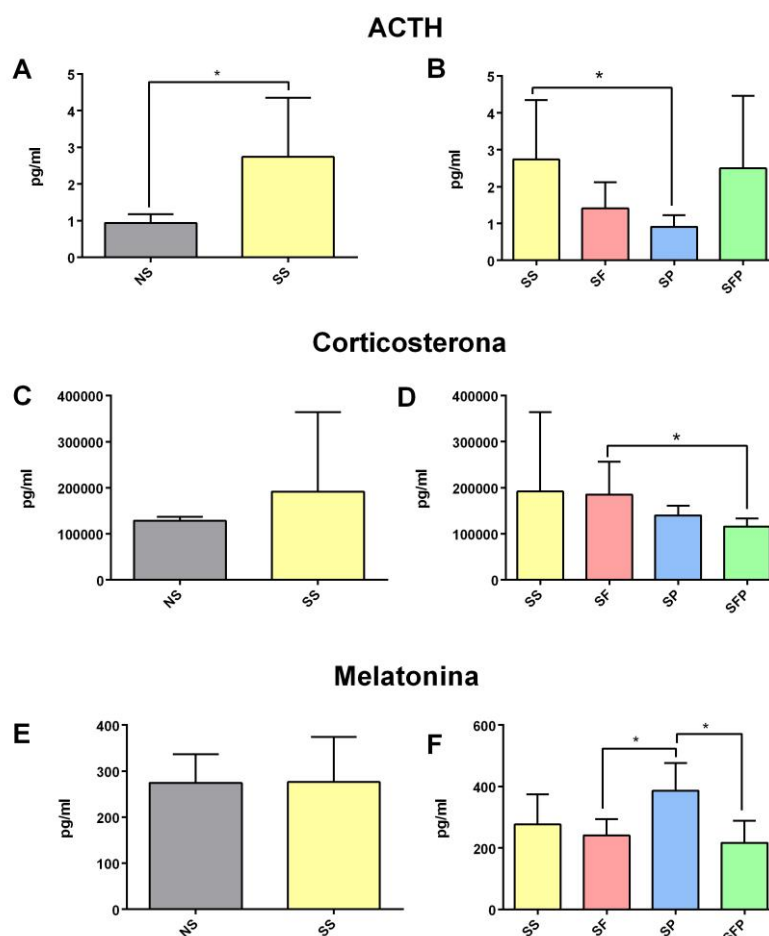
comparados aos grupos medicados SF e SFP ($p = 0,02$) (Figura 15F).

Tabela 3 – Valores dos níveis séricos de hormônios biomarcadores de estresse analisados por ensaio Multiplex e representados pela média e desvio padrão (DP) de cada grupo

Grupos		ACTH (pg/ml)	Corticotesterona (pg/ml)	Melatonina (pg/ml)
NS		0,93 ± 0,24	128206 ± 8455	274,5 ± 62,29
SS		2,74 ± 1,60	191491 ± 172713	276,2 ± 98,31
SF	Média ± DP	1,40 ± 0,71	184695 ± 71658	240,9 ± 52,82
SP		0,90 ± 0,32	139925 ± 20832	385,9 ± 90,76
SFP		2,49 ± 1,9	115587 ± 17793	216,7 ± 71,36

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 15 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores dos níveis séricos dos biomarcadores de estresse analisados por ensaio Multiplex



Legenda: a) comparação dos níveis séricos de ACTH entre os grupos controle (variável independente: estresse); b) comparação dos níveis séricos de ACTH entre os grupos estressados (variável independente: medicamento); c) comparação dos níveis séricos de corticosterona entre os grupos controle (variável independente: estresse); d) comparação dos níveis séricos de corticosterona entre os grupos estressados (variável independente: medicamento); e) comparação dos níveis séricos de melatonina entre os grupos controle (variável independente: estresse); f) comparação dos níveis séricos de melatonina entre os grupos estressados (variável independente: medicamento).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A estatística descritiva dos valores obtidos pelo ensaio Multiplex referente aos níveis séricos de citocinas inflamatórias está representada na Tabela 4.

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos NS e SS em relação aos níveis séricos das citocinas inflamatórias avaliadas ($p > 0,05$) (Figura 16). Na análise estatística entre os grupos estressados, nenhuma diferença estatística significativa foi observada em relação aos níveis séricos das citocinas

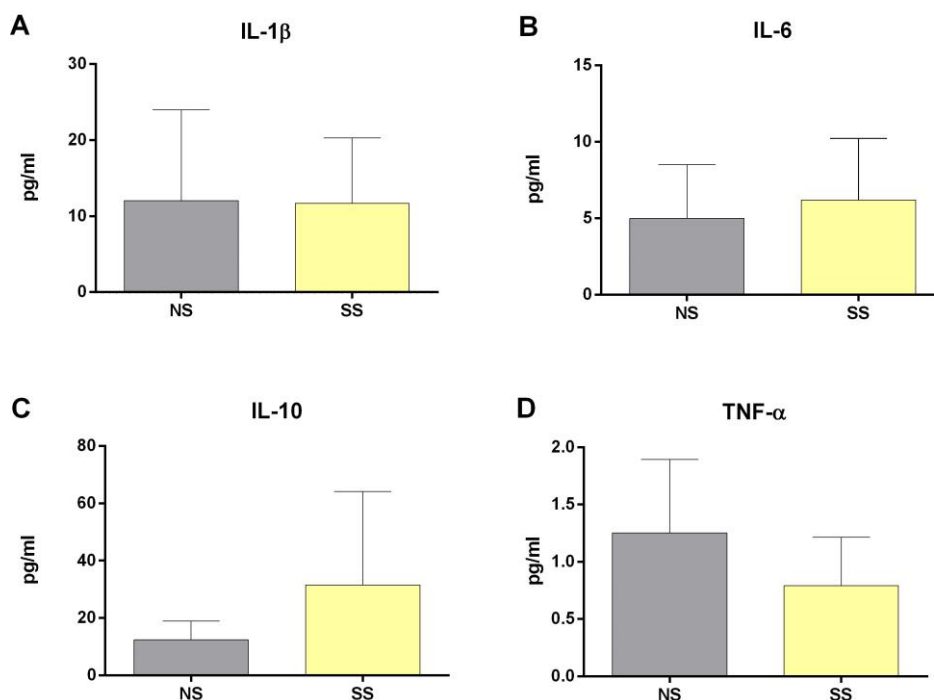
inflamatórias avaliadas, exceto pela IL-10 que se mostrou significativamente mais elevada no grupo SF, sendo estatisticamente diferente comparada ao grupo SP ($p = 0,04$) (Figura 17).

Tabela 4 – Valores dos níveis séricos de citocinas inflamatórias analisados por ensaio Multiplex e representados pela média e desvio padrão (DP) de cada grupo

Grupos		IL-1 β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
NS		12,03 $\pm$ 11,97	4,99 $\pm$ 3,50	12,36 $\pm$ 6,59	1,25 $\pm$ 0,64
SS		11,70 $\pm$ 8,58	6,18 $\pm$ 4,04	31,58 $\pm$ 32,58	0,79 $\pm$ 0,42
SF	Média $\pm$ DP	58,94 $\pm$ 41,51	11,49 $\pm$ 14,53	237,4 $\pm$ 156,8	0,79 $\pm$ 0,63
SP		9,68 $\pm$ 11,57	5,74 $\pm$ 4,36	32,56 $\pm$ 49,99	0,64 $\pm$ 0,34
SFP		40,86 $\pm$ 54,35	18,81 $\pm$ 21,81	168,8 $\pm$ 213,9	0,75 $\pm$ 0,49

Fonte: Elaborada pelo autor.

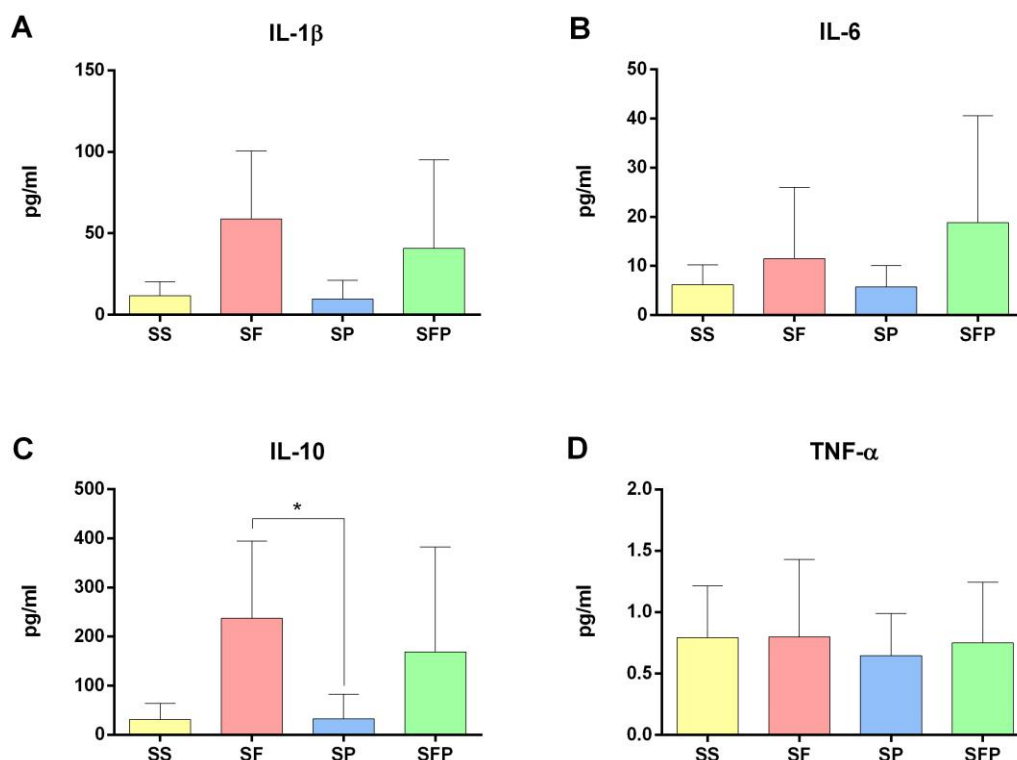
Figura 16 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores dos níveis séricos de citocinas inflamatórias nos grupos NS e SS analisados por ensaio Multiplex



Legenda: a) comparação dos níveis séricos de IL-1 β entre os grupos controle (variável independente: estresse); b) comparação dos níveis séricos de IL-6 entre os grupos controle (variável independente: estresse); c) comparação dos níveis séricos de IL-10 entre os grupos controle (variável independente: estresse); d) comparação dos níveis séricos de TNF- α entre os grupos controle (variável independente: estresse).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 17 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores dos níveis séricos de citocinas inflamatórias nos grupos estressados (SS, SF, SP e SFP) analisados por ensaio Multiplex



Legenda: a) comparação dos níveis séricos de IL-1 β entre os grupos estressados (variável independente: medicamento); b) comparação dos níveis séricos de IL-6 entre os grupos estressados (variável independente: medicamento); c) comparação dos níveis séricos de IL-10 entre os grupos estressados (variável independente: medicamento); d) comparação dos níveis séricos de TNF- α entre os grupos estressados (variável independente: medicamento)
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 Estrutura óssea periapical por micro-CT

Foi observada uma diferença estatística em relação ao volume e área de lesão periapical na comparação entre os grupos controle, uma vez que o grupo NS apresentou valores médios significativamente menores que os animais estressados do grupo SS ($p = 0,03$ e $p = 0,015$, respectivamente) (Figura 18). Em relação aos animais estressados, todos os grupos medicados apresentaram lesões periapicais significativamente menores, em volume e área, comparados ao grupo SS ($p = 0,003$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Na Tabela 5, estão descritos os valores médios e

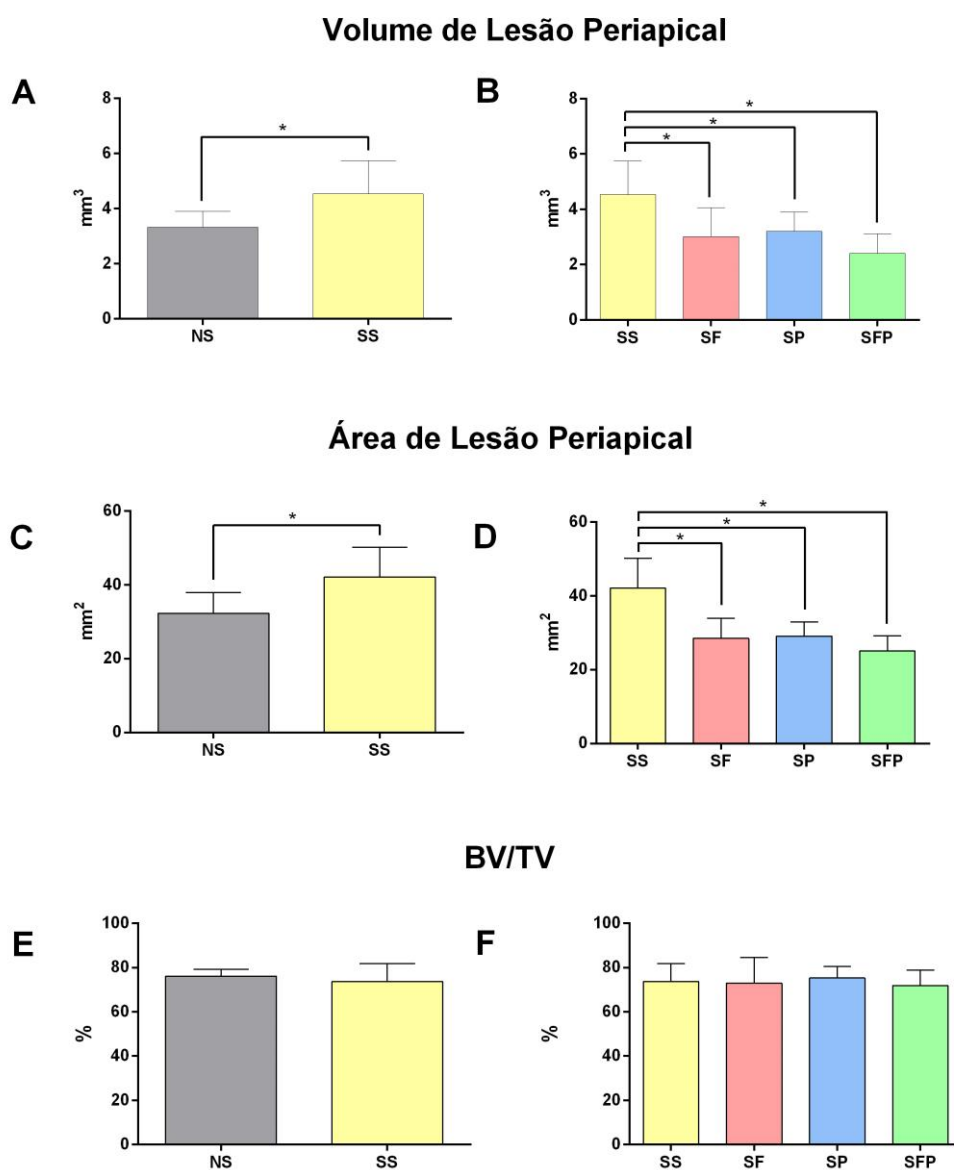
desvio padrão de cada parâmetro analisado. Não houve diferença estatística em nenhuma das comparações em relação a proporção de volume total e volume de lesão (BV/TV).

Tabela 5 – Valores obtidos em relação aos diferentes parâmetros analisados por micro-CT representados pela média e desvio padrão (DP) de cada grupo

Grupos		Volume de Lesão Periapical (mm ³)	Área de Lesão Periapical (mm ²)	Proporção BV/TV (%)
NS		3,33 ± 0,56	32,30 ± 5,55	76,11 ± 3,11
SS		4,53 ± 1,20	42,11 ± 8,09	73,71 ± 8,07
SF	Média ± DP	3,01 ± 1,05	28,49 ± 5,49	72,84 ± 11,76
SP		3,20 ± 0,69	29,11 ± 3,87	75,32 ± 5,10
SFP		2,40 ± 0,70	25,06 ± 4,18	71,89 ± 6,88

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 18 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores dos parâmetros analisados por micro-CT



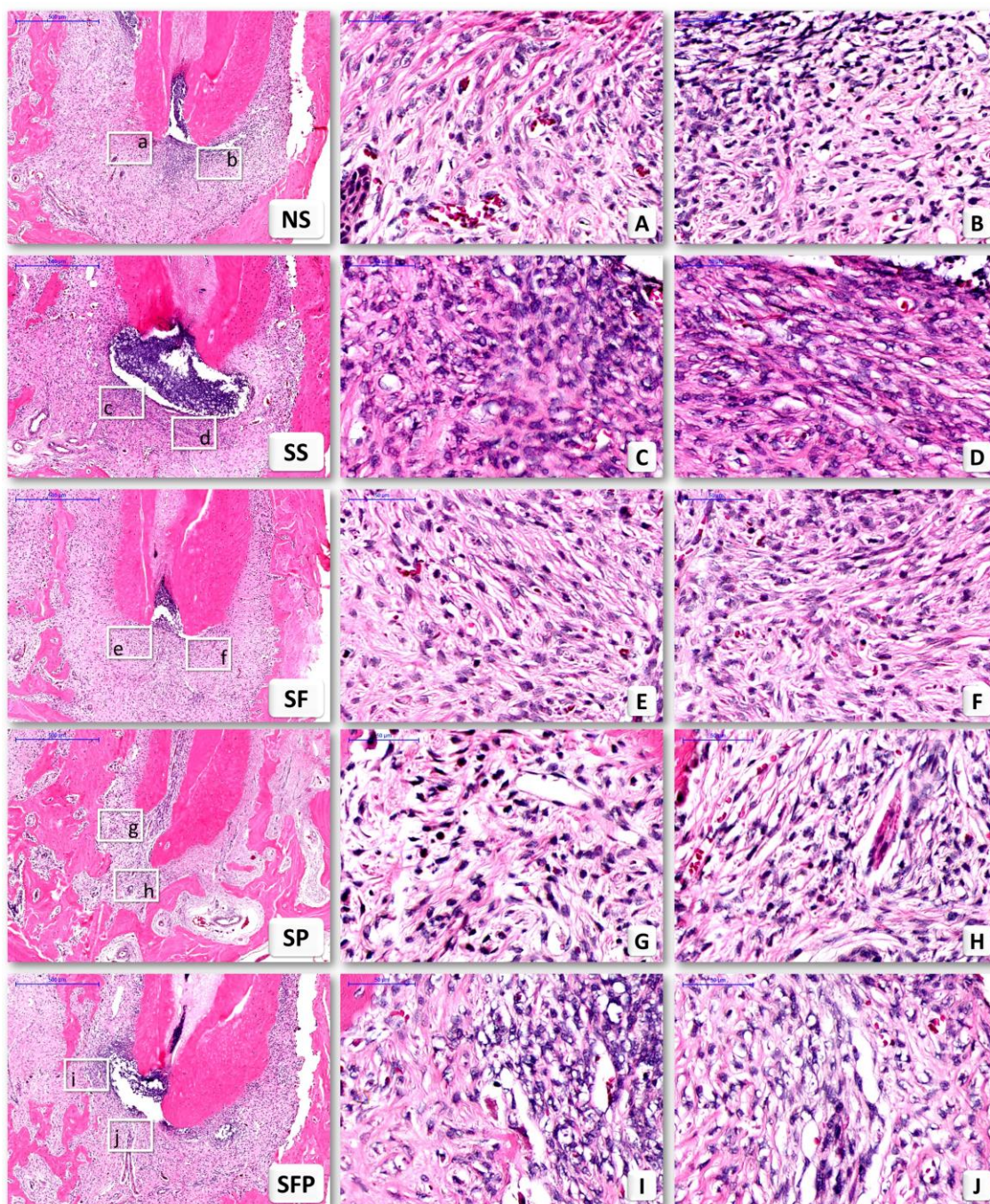
Legenda: BV: bone volume; TV: tissue volume; a) comparação do volume de lesão periapical entre os grupos controle (variável independente: estresse); b) comparação do volume de lesão periapical entre os grupos estressados (variável independente: medicamento); c) comparação da área de lesão periapical entre os grupos controle (variável independente: estresse); d) comparação da área de lesão periapical entre os grupos estressados (variável independente: medicamento); e) comparação da proporção BV/TV entre os grupos controle (variável independente: estresse); f) comparação da proporção BV/TV entre os grupos estressados (variável independente: medicamento).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5 Análise histológica

A evidência de inflamação foi observada em todos os grupos (Figura 19 A-J). Todos os grupos apresentaram lesão periapical estabelecida composta predominantemente de um infiltrado inflamatório crônico. As lesões periapicais foram principalmente restritas à região periapical e apresentaram características do granuloma periapical.

Figura 19 – Representação dos aspectos histológicos de cada grupo após coloração com hematoxilina e eosina



Legenda: a, b) infiltração crônica leve de células inflamatórias na região periapical do grupo NS; c, d) infiltração crônica intensa de células inflamatórias na região periapical do grupo SS; e, f) infiltração crônica leve de células inflamatórias na região periapical do grupo SF; g, h) infiltração crônica leve de células inflamatórias no grupo SP; i, j) infiltração crônica moderada de células inflamatórias na região periapical do grupo SFP.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Histologicamente, o infiltrado inflamatório do grupo SS foi mais severo do que o do grupo NS ($p = 0,04$) além de apresentar maior extensão de infiltrado inflamatório e maior área de reabsorção óssea quando comparado com o grupo NS ($p = 0,02$ e $p = 0,003$, respectivamente) (Figura 20).

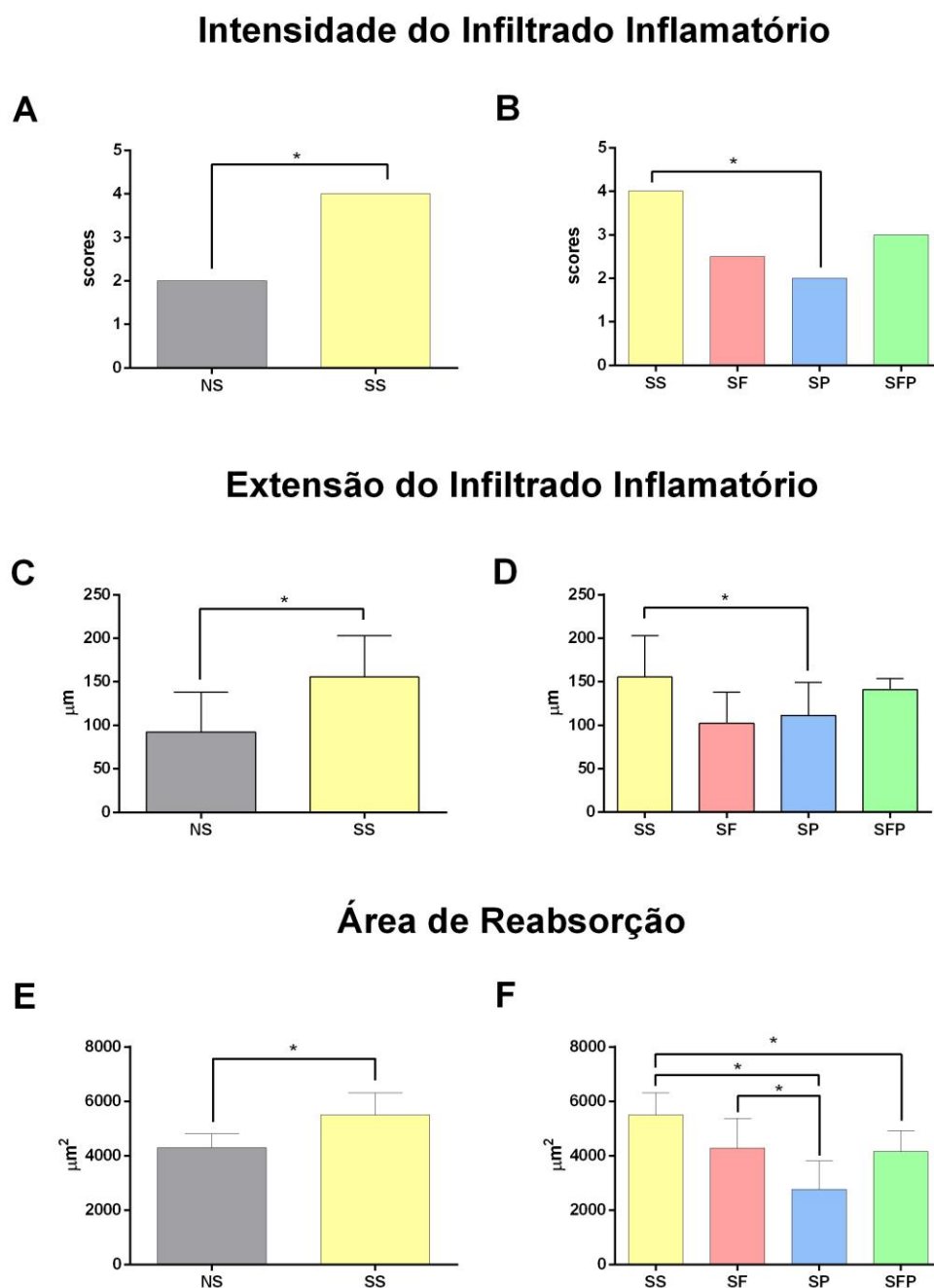
A comparação entre os grupos estressados revelou que o grupo SP apresentou menor intensidade e extensão de infiltrado inflamatório comparado ao grupo SS ($p = 0,035$ e $p = 0,042$, respectivamente), mas sem diferença em relação aos demais grupos medicados. Em relação a área de reabsorção óssea os grupos SP e SFP apresentaram valores áreas de lesão periapical significativamente menores comparadas ao grupo SS ($p = 0,0002$), sendo que o grupo SP ainda foi estatisticamente diferente comparado ao grupo SF ($p = 0,02$) (Figura 20). Os valores dos scores atribuídos para os critérios de intensidade do infiltrado inflamatório e os valores médios de cada grupo em relação a extensão do infiltrado e área de reabsorção óssea estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Valores obtidos em relação aos diferentes parâmetros histológicos analisados em cada grupo

Grupos	Intensidade do Infiltrado Inflamatório					Área de Lesão (μm^2)	Extensão do infiltrado (μm)
	Scores					Média $\pm$ DP	
	1	2	3	4	Mediana		
NS	0/8	5/8	3/8	0/8	2	4297 $\pm$ 515,6	92,50 $\pm$ 45,54
SS	0/8	2/8	1/8	5/8	4	5502 $\pm$ 801,7	155,6 $\pm$ 47,60
SF	0/8	4/8	2/8	2/8	2,5	4275 $\pm$ 1101	102,01 $\pm$ 35,99
SP	1/8	4/8	3/8	0/8	2	2771 $\pm$ 1040	111,40 $\pm$ 37,89
SFP	0/8	1/8	4/8	3/8	3	4155 $\pm$ 762,7	140,90 $\pm$ 12,99

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 20 – Representação gráfica da estatística inferencial referente aos valores dos parâmetros histológicos avaliados



Legenda: a) comparação da intensidade do infiltrado inflamatório entre os grupos controle (variável independente: estresse); b) comparação da intensidade do infiltrado inflamatório entre os grupos estressados (variável independente: medicamento); c) comparação da extensão do infiltrado inflamatório entre os grupos controle (variável independente: estresse); d) comparação da extensão do infiltrado inflamatório entre os grupos estressados (variável independente: medicamento); e) comparação da área de reabsorção entre os grupos controle (variável independente: estresse); f) comparação da área de reabsorção entre os grupos estressados (variável independente: medicamento).

Fonte: Elaborada pelo autor.

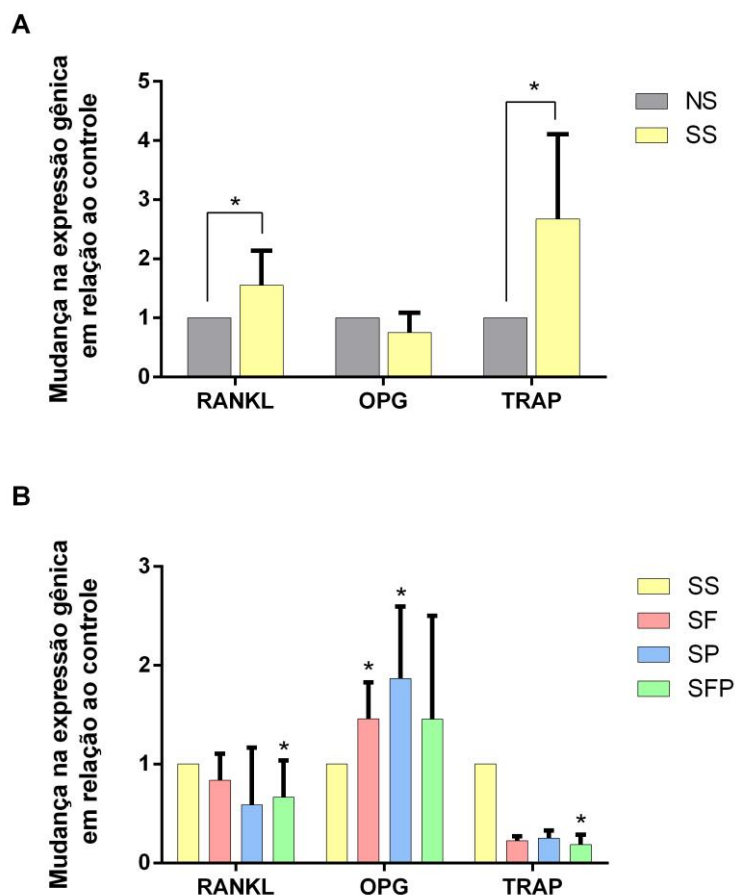
5.6 Expressão gênica de biomarcadores da reabsorção óssea e citocinas inflamatórias por RT-PCR

As amostras ósseas da região periapical dos molares superiores foram obtidas e armazenadas em solução de RNA later até o momento de sua utilização.

Os resultados da quantificação relativa representam a variação no nível de expressão dos genes alvos no grupo SS em relação a amostra calibradora NS, e nos grupos experimentais SF, SP e SFP em relação a amostra calibradora SS. Todas as reações foram feitas em duplicata. Os resultados foram obtidos como valores relativos da expressão gênica (com base na fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$) em comparação a um alvo-interno de referência, previamente selecionado, e que resulta em valor 1.

A expressão relativa dos genes alvos RANK, OPG e TRAP está demonstrada na Figura 21. De acordo com os resultados obtidos, a expressão gênica de RANKL e TRAP foi significativamente mais alta no grupo estressado SS em relação ao grupo NS ($p = 0,0183$ e $p = 0,0053$, respectivamente). Não houve diferença estatística em relação a expressão gênica de OPG ($p > 0,05$). Em relação aos grupos estressados o grupo SF e SP apresentaram uma expressão de OPG significativamente mais alta em relação ao grupo SS ($p = 0,0033$ e $p = 0,0046$, respectivamente), e o grupo SFP foi o único grupo experimental a apresentar uma supressão da expressão gênica de RANKL e TRAP, que foi significativamente inferior em relação ao grupo SS ($p = 0,0238$ e $p = 0,0259$, respectivamente).

Figura 21 - Expressão gênica de RANKL OPG e TRAP

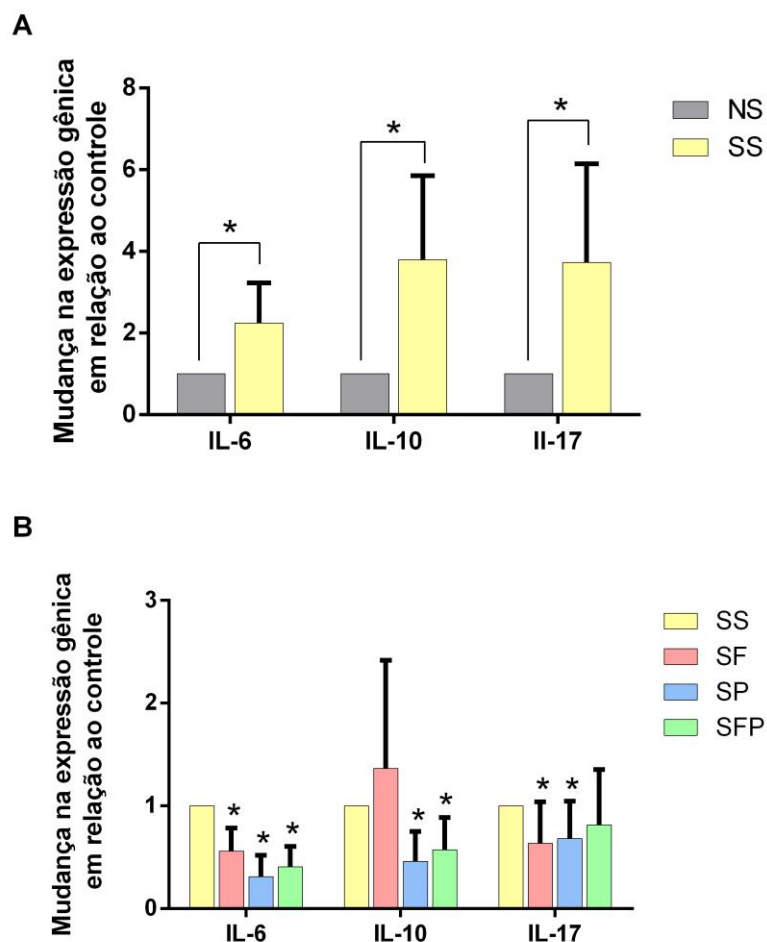


Legenda: a) mudança na expressão relativa de RANKL, OPG e TRAP no grupo SS em relação a amostra calibradora NS (variável independente: estresse); b) mudança na expressão relativa de RANKL, OPG e TRAP nos grupos medicados em relação a amostra calibradora SS (variável independente: medicamento).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A expressão gênica relativa das citocinas inflamatórias IL-6, IL-10 e IL-17 está demonstrada na Figura 22. De acordo com os resultados obtidos, a expressão gênica de IL-6, IL-10 e IL-17 foi significativamente mais alta no grupo estressado SS em relação ao grupo NS ($p = 0,0029$, $p = 0,0018$ e $p = 0,0067$, respectivamente). Em relação ao grupo controle SS, todos os grupos medicados SF, SP e SFP apresentaram menor expressão da IL-6 ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ e $p = 0,002$, respectivamente). A IL-10 foi menos expressa nos grupos SP ($p = 0,0001$) e SFP ($p = 0,0017$), enquanto a IL-17 foi menos expressa nos grupos SF ($p = 0,0228$) e SP ($p = 0,0002$).

Figura 22 - Expressão gênica das citocinas inflamatórias IL-6 IL-10 e IL-17



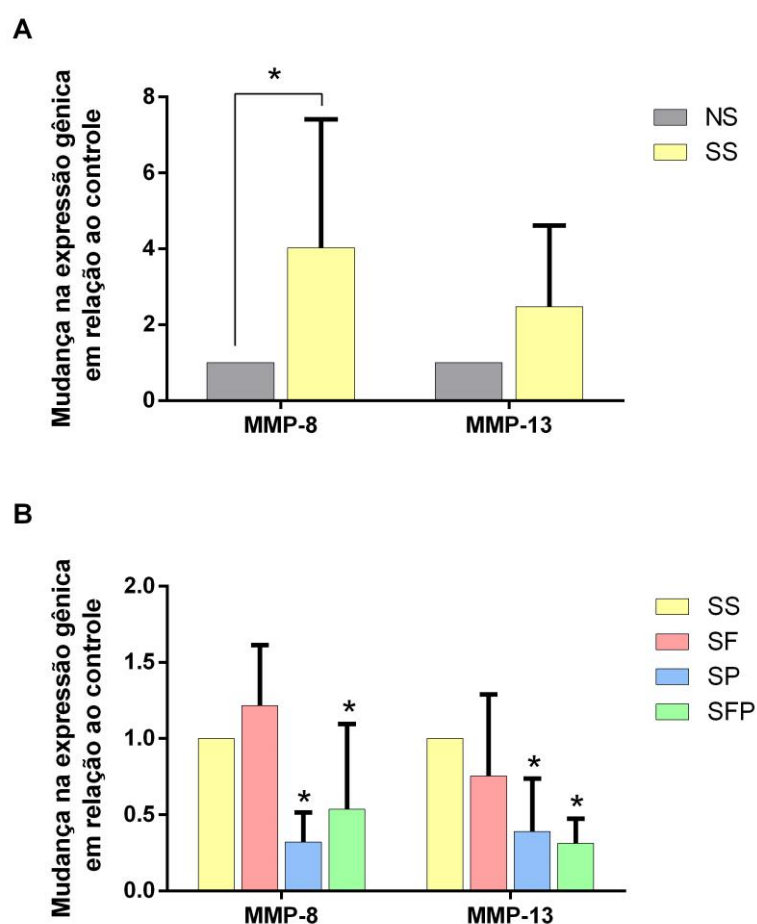
Legenda: a) mudança na expressão relativa de IL-6, IL-10 e IL-17 no grupo SS em relação a amostra calibradora NS (variável independente: estresse); b) mudança na expressão relativa de IL-6, IL-10 e IL-17 nos grupos medicados em relação a amostra calibradora SS (variável independente: medicamento).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A expressão gênica relativa da MMP-8 e MMP-13 está demonstrada na Figura 23. De acordo com os resultados obtidos, a expressão gênica de MMP-8 foi significativamente mais alta no grupo estressado SS em relação ao grupo NS ($p = 0,0243$) mas não houve diferença significativa em relação a expressão de MMP-13 no grupo SS em relação ao NS ($p > 0,05$). Em relação aos grupos estressados, os grupos SP e SFP apresentaram menor expressão relativa de ambas MMPs avaliadas, MMP8 ($p = 0,0002$ e $p = 0,0344$, respectivamente) e MMP-13 ($p = 0,0002$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Não houve diferença significativa na expressão

gênica de nenhuma das MMPs avaliadas no grupo SF em relação ao grupo SS ($p > 0,05$).

Figura 23 - Expressão gênica de MMP-8 e MMP-13



Legenda: a) mudança na expressão relativa de MMP-8 e MMP-13 no grupo SS em relação a amostra calibradora NS (variável independente: estresse); b) mudança na expressão relativa de MMP-8 e MMP-13 nos grupos medicados em relação a amostra calibradora SS (variável independente: medicamento).

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

A endodontia tem ganhado destaque na comunidade científica ao longo dos últimos anos devido ao aumento de estudos clínicos e em modelos animais com foco na medicina endodôntica, que visam avaliar a inter-relação entre as condições patológicas sistêmicas e periapicais. Tais estudos têm demonstrado que alterações sistêmicas podem potencializar a patogênese da infecção endodôntica, favorecendo seu desenvolvimento e progressão (Arya et al., 2017; Samuel et al., 2019). O impacto do estresse no sistema imunológico já é bem estabelecido na literatura (Glaser, Kiecolt-Glaser, 2005) e, portanto, uma possível influência do estresse sobre uma doença inflamatória crônica, como a PA, parece plausível.

O estresse crônico é uma condição conhecida por exercer diversos efeitos sobre a saúde, sendo considerado um importante fator de risco para vários distúrbios psicológicos, incluindo depressão e ansiedade (Koob, 1999; McEwen, 2006). Tais condições possuem um forte impacto na saúde sistêmica considerando que muitos desses efeitos são causados por uma ação direta do estresse sobre o sistema imunológico (Dhabhar, 2009; Dhabhar et al., 2012; Padro, Sanders, 2014). Embora inúmeros fatores estejam envolvidos, os principais mediadores dos efeitos do estresse são a norepinefrina e a epinefrina, que são liberadas pelo sistema nervoso simpático, e o hormônio liberador de corticotropina, adrenocorticotropina e cortisol, que surgem após a ativação do eixo HPA (Glaser, Kiecolt-Glaser, 2005). Como praticamente todas as células do corpo expressam receptores para um ou mais desses fatores, os hormônios do estresse podem induzir mudanças em quase todas as células e tecidos, e informá-los sobre a presença de um estressor. Nesse sentido, é importante elucidar os mecanismos psicológicos e biológicos pelos quais os estressores crônicos enfraquecem a saúde ou agravam a doença, pois isso pode permitir o desenvolvimento de tratamentos biocomportamentais e farmacológicos destinados a melhorar ou eliminar os efeitos prejudiciais do estresse crônico. Neste trabalho, além de investigar a influência do estresse sobre a patogênese da PA, também buscou-se avaliar o efeito do medicamento bloqueador beta-adrenérgico Propranolol, e do antidepressivo da classe dos ISRS, Fluoxetina, bem como sua associação.

6.1 Modelo animal de PA e estresse crônico

Os modelos animais são amplamente utilizados para avaliar os mecanismos pelos quais diversos fatores ambientais e comportamentais podem interferir na resposta do organismo. Ratos e camundongos têm sido amplamente utilizados para avaliar o desenvolvimento de PA induzida (Jara et al., 2018; Kalatzis-Sousa et al., 2017; Yang et al., 2014). Além de uma microbiota oral semelhante, estes animais compartilham uma anatomia dentária similar aos humanos e, portanto, são um modelo adequado para o estudo de lesões periapicais (Yoneda et al., 2017). Além disso, a indução de PA em ratos permite aos pesquisadores excluirmos fatores extrínsecos que são difíceis de controlar, caso a investigação fosse realizada como um estudo clínico (Cintra et al., 2016; Dal-Fabbro et al., 2019; Gomes-Filho et al., 2015; Tani-Ishii et al., 1994). Neste estudo, o modelo de PA empregado tem respaldo na literatura científica sendo amplamente descrito em estudos prévios (Cintra et al., 2016; Cosme-Silva et al., 2019, 2020; Dal-Fabbro et al., 2019; Gomes-Filho et al., 2015).

Na última década, a associação entre transtornos psicossociais e doenças bucais foi extensivamente pesquisada na literatura científica (Mendes et al., 2012; Monteiro da Silva et al., 1996; Peruzzo et al., 2007). Apesar dos numerosos estudos epidemiológicos e experimentais sustentarem uma ligação entre a doença periodontal e fatores psicológicos, a relação entre a PA e a imunossupressão induzida por estresse ainda é escassa e necessita uma maior elucidação.

Até o momento, existem mais de 20 tipos de modelos animais depressivos, dentre os quais o modelo de estresse crônico imprevisível, desenvolvido originalmente por Willner et al. (1987), é o mais amplamente descrito e validado na literatura para explorar os mecanismos subjacentes à psicopatologia humana (Jiang et al., 2013; Zhang et al., 2019, 2012). Neste modelo, os animais são expostos a diferentes estressores, aplicados de modo aleatório, a fim de prevenir a habituação, por um período que pode variar de 5 a 9 semanas. Este protocolo é conhecido por induzir uma infinidade de mudanças comportamentais e fisiológicas características da depressão e ansiedade, além de ativar os mecanismos inflamatórios, conforme

documentado em estudos prévios (Blossom et al., 2020). Embora o modelo em questão seja denominado “estresse crônico imprevisível”, a literatura revisada cobre uma gama de procedimentos aparentemente diferentes mas sempre mantendo a principal premissa de expor os animais, diariamente, a uma variedade de estressores, em uma sequência relativamente aleatória por um longo período de tempo (Willner, 2016).

Há uma grande variedade de protocolos de estresse crônico imprevisível publicados na literatura e, portanto, inconsistências em relação aos resultados imunológicos são comumente observadas (Nestler, Hyman, 2010). Entre as principais razões para tais contradições estão diferenças inerentes de suscetibilidade / resistência ao estresse em protocolos distintos que podem variar em termos de duração, intensidade e cronicidade. Além disso, Dhabhar e McEwen, (1997) descreveram vários parâmetros fisiológicos que podem afetar a função imune *in vivo* e ressaltam que, dependendo do desenho do experimento, ele pode tanto potencializar quanto suprimir a resposta imunológica.

A fim de caracterizar um modelo animal apropriado para estudar a relação deletéria que o estresse crônico poderia exercer sobre a PA, Minhoto et al. (2021) realizaram um estudo avaliando de forma cronológica os efeitos que o estresse exerce ao longo do desenvolvimento da PA em três momentos distintos, num intervalo de 14, 21 e 28 dias. Os autores relataram que o modelo de estresse crônico imprevisível aplicado por 6 semanas exacerbou a resposta inflamatória e aumentou a perda óssea na região periapical, principalmente aos 21 dias após a indução da PA.

Na presente pesquisa, o protocolo de estresse utilizado por Minhoto et al. (2021) foi igualmente reproduzido, durante um período total de 6 semanas de estresse crônico, utilizando o intervalo de 21 dias de exposição pulpar a fim de confirmar os efeitos nocivos do estresse sobre a PA e testar diferentes abordagens terapêuticas que possam elucidar o mecanismo subjacente de modulação do estresse sobre a doença inflamatória periapical.

6.2 Monitoramento da massa corporal

Nesta pesquisa, o monitoramento da massa corporal dos animais foi tomado como um dos parâmetros de estabelecimento do estresse crônico. Ao avaliar a alteração de peso dos animais, observou-se que o ganho de massa corporal nos animais estressados do grupo SS foi significativamente menor quando comparados aos animais não estressados do grupo NS, corroborando com os achados de diversos estudos prévios que demonstram que os animais expostos ao estresse crônico imprevisível apresentam uma perda relativa de massa corporal associada a um ganho de massa mais lento (Hong et al., 2021; Jiang et al., 2013; Lin et al., 2005; Luo et al., 2008; Vitale et al., 2009; Willner et al., 1996, 1992). Embora a perda de peso possa ser atribuída aos períodos de privação de comida em que os animais estressados foram submetidos, outros estudos que excluíram esse tipo de estressor (privação) do modelo de estresse crônico imprevisível também observaram a perda de peso significativa entre animais estressados (Bertrand et al., 1997).

Além disso, vale destacar que os grupos estressados SF e SFP apresentaram uma redução de peso acentuada ao longo das três primeiras semanas e um ganho de peso significativamente menor ao final do estudo comparado aos demais grupos estressados. Este resultado corrobora com diversos estudos na literatura que descrevem a perda de apetite e redução de peso como uns dos principais efeitos colaterais comumente associados ao uso crônico da Fluoxetina, que é aparentemente mediado pelo impacto da Fluoxetina nas vias de sinalização da serotonina (Chojnacki et al., 2015; Curzon et al., 1997; Voznesenskaia et al., 2000). A Fluoxetina inibe seletivamente a captação de serotonina *in vitro* e *in vivo* e, portanto, aumenta a função serotoninérgica, levando a uma diminuição na ingestão de alimentos a partir da primeira dose e uma diminuição no peso corporal ou no ganho de peso após múltiplas doses de Fluoxetina (Fuller, Snoddy, 1986; Wong et al., 1985). Por outro lado, o grupo SP apresentou uma alteração de peso semelhante ao grupo controle SS.

6.3 Dosagem hormonal de biomarcadores de estresse

O eixo HPA desempenha um papel fundamental no sistema neuroendócrino e participa diretamente na regulação e adaptação da resposta do organismo frente ao estresse físico ou psicológico. A hiperatividade do eixo HPA é uma das principais alterações fisiopatológicas associadas ao transtorno depressivo (Holsboer, Barden, 1996). No processo patológico de depressão, o eixo HPA exibe um estado hiperativo e o cérebro inicia uma cascata hormonal (Bangsgaard, Ottesen, 2017; Pariante, Lightman, 2008). Ativada pelo hormônio liberador de corticotropina (CRH), a hipófise libera ACTH que por sua vez, resulta na secreção de cortisol / corticosterona e outros glicocorticoides das glândulas adrenais. Esses corticoides envolvem todo o corpo na resposta ao estresse e estão envolvidos no término desta resposta através de um ciclo de feedback negativo para o hipotálamo.

A corticosterona é o principal glicocorticoide liberado pelo córtex das adrenais de roedores e comumente reconhecido por sua função imunossupressora. Embora estes hormônios sejam os primeiros responsáveis pelo restabelecimento da homeostase, quando sua produção se torna prolongada, eles também podem apresentar efeitos prejudiciais (Herman et al., 2016). Portanto, o estabelecimento do status de estresse parece ser mais confiável quando anormalidades na função adrenocortical e no comportamento são usadas como parâmetros (Ottenweller et al., 1989). Alguns estudos demonstraram que os animais estressados cronicamente mostram sinais de hiperatividade do eixo HPA, incluindo hipertrofia adrenal (Muscat, Willner, 1992) e hipersecreção de corticosterona (Ayensu et al., 1995). Portanto, neste trabalho, além do monitoramento da massa corporal dos animais, dosagens séricas de hormônios relacionados ao estresse foram realizadas a fim de explorar possíveis mecanismos envolvidos no quadro de estresse.

A corticosterona foi primeiramente avaliada através do teste de radioimunoensaio, uma técnica amplamente utilizada nas dosagens hormonais de diferentes espécies, e reconhecida por sua eficiência e aplicabilidade (Bekhat et al., 2018). No entanto, de acordo com os resultados do presente estudo, não foi observada qualquer diferença entre os grupos em ambas as comparações, tanto entre os grupos controle, quanto entre os grupos estressados em relação aos níveis séricos de corticosterona. A deficiência do protocolo de estresse crônico imprevisível em aumentar os níveis de corticosterona em ratos adultos jovens (3 meses de idade) contrasta com relatos que indicam que o estresse crônico induz níveis elevados de

glicocorticoides (Herman et al., 1995; Ulrich-Lai et al., 2006). Portanto, a ausência de diferença entre os grupos controle NS e SS conflita com os resultados obtidos em outros estudos anteriores que também utilizaram a corticosterona como parâmetro indicativo de indução de estresse (Lowrance et al., 2016). Segundo Bekhbat et al. (2018), a escolha de um ensaio para determinar os níveis de corticosterona pode impactar diretamente a interpretação dos dados e, conseqüentemente, as conclusões obtidas em relação à resposta endócrina de um modelo animal de estresse. Embora exista uma forte correlação entre os diferentes métodos existentes, além da variação dinâmica de concentrações fisiológicas de corticosterona, as variáveis de pré-tratamento da amostra, sensibilidade do ensaio, intervalo da curva padrão e exposição à temperatura ambiente específica para cada ensaio, podem contribuir para a variabilidade entre os resultados (Bekhbat et al., 2018).

A fim de validar os resultados obtidos pelo radioimunoensaio e aprofundar a investigação em relação ao comportamento endócrino, optamos por realizar uma nova dosagem hormonal através do teste de imunoensaio multiplex, utilizando o método de detecção fluorométrico (Luminex xMAP). Esta técnica utiliza um formato de imunoensaio de esfera magnética para velocidade e sensibilidade específicas que permitem a quantificação de vários analitos de forma simultânea, melhorando drasticamente a produtividade e permitindo a conservação de um volume considerável de amostra. Assim, o kit para roedores MILLIPLEX® MAP foi usado para a quantificação de outros hormônios relacionados ao estresse que contém outros analitos além da corticosterona, como o ACTH e a melatonina.

Em relação a corticosterona, os resultados observados no imunoensaio multiplex estavam em consonância com os resultados previamente obtidos pelo Radioimunoensaio, e, portanto, não foi encontrada diferença entre os níveis de corticosterona dos ratos do grupo controle não-estressado (NS) e estressado (SS). Os resultados obtidos em nosso estudo estão de acordo com o estudo de José Jaime et al. (2016), que utilizaram um protocolo de estresse crônico semelhante ao aplicado nesta pesquisa e também relataram a ausência de significância estatística entre os animais do grupo controle e estressado.

Em contraste com os resultados aqui apresentados, existem diversos estudos nos quais os animais expostos a várias semanas de estresse crônico

mostraram níveis elevados de corticosterona em comparação com os animais não estressados (Bachis et al., 2008; Grippo et al., 2005; Konkle et al., 2003; Zheng et al., 2006). No entanto, é importante ressaltar que em tais estudos os autores também observaram alterações comportamentais típicas da depressão, como a anedonia, o que não foi levado em consideração na presente pesquisa. Embora fosse esperado que o protocolo de estresse crônico aumentasse os níveis plasmáticos de corticosterona (Goshen et al., 2008; Kvarta et al., 2015), existem diversos relatos na literatura de que este modelo induziu comportamentos típicos de depressão e anedonia, mesmo na ausência de uma elevação detectável da corticosterona plasmática (Remus et al., 2015; Willner et al., 1987).

Os resultados conflitantes sugerem uma possível habituação dos animais aos estressores empregados no cronograma de estresse crônico imprevisível, reforçando a ideia de que os picos de corticosterona são produzidos em resposta ao início de cada estressor individual (Magariños et al., 1996; Sapolsky et al., 1984). Este dado reforça a premissa de que o momento específico de obtenção das amostras sanguíneas para análise hormonal é um fator crítico para interpretação dos resultados. Além disso, a variação na intensidade dos estressores, bem como o intervalo de tempo entre os estressores aplicados ao longo do dia também são fatores que podem atenuar o acúmulo de consequências fisiológicas ao longo do tempo (Cavigelli et al., 2018). Corroborando este raciocínio, uma das regras de habituação que parecem governar a adaptação a um estressor crônico afirma que “a redução progressiva das respostas a um estímulo repetido está negativamente relacionada à sua intensidade” (Armario et al., 2008). Segundo Cavigelli et al. (2018), estímulos estressores moderados quando aplicados de forma dispersa (manhã/tarde/noite) podem exercer um menor impacto fisiológico do que os estressores que ocorrem mais próximos no tempo. De acordo com os autores, uma distribuição temporal mais espaçada entre a aplicação dos estressores pode permitir tempo suficiente para que os efeitos específicos de cada estressor se dissipem antes que ocorram outros estressores, atenuando o acúmulo de consequências fisiológicas ao longo do tempo (Cavigelli et al., 2018). No estudo de Cavigelli et al. (2018) os animais que receberam os estressores agudos em períodos dispersos tiveram um declínio atenuado da corticosterona.

Por outro lado, os resultados mostraram que os níveis de ACTH no grupo

controle SS foram significativamente mais elevados comparado ao grupo NS. Além disso, vale notar que na comparação entre os grupos estressados, o grupo medicado com Propranolol foi capaz de reduzir significativamente os níveis de ACTH em relação ao grupo controle estressado SS. Estes resultados demonstraram que o aumento do ACTH induzido pelo estresse crônico foi revertido pelo tratamento com Propranolol através de uma mediação regulado pelo eixo HPA.

A melatonina, é um hormônio produzido e secretado pela glândula pineal de forma circadiana, que circula por todo o organismo regulando diversas funções corporais e atingindo níveis máximos durante a fase escura do ciclo claro-escuro (Cutolo, Maestroni, 2005). A síntese e liberação de melatonina são estimuladas pela norepinefrina via receptores beta1-adrenérgicos podendo inclusive ser potencializado pela estimulação de receptores alfa-1 adrenérgicos (Brismar et al., 2009; Klein et al., 1983). Consequentemente, o uso de bloqueadores beta-adrenérgicos como o Propranolol impede que a noradrenalina se ligue à glândula pineal e deste modo limita a síntese de melatonina (Simonneaux, Ribelayga, 2003). Neste estudo, apesar da ausência de significância estatística entre os grupos controle estressado e não-estressado, o grupo medicado com Propranolol apresentou concentrações séricas significativamente elevadas de melatonina quando comparadas aos demais grupos SF e SFP. Embora este dado esteja em conflito com a maioria dos estudos que demonstram níveis reduzidos de melatonina sob o uso de bloqueadores adrenérgicos, é importante ressaltar que o desenho deste estudo não levou em consideração a influência de bloqueadores adrenérgicos sobre os níveis de melatonina, visto que atividades físicas também podem modificar a secreção de melatonina (Buxton et al., 2003). Portanto, considerando que o cronograma de estresse aplicado na presente pesquisa incluía períodos de atividade física, como a natação forçada, uma resposta incomum da síntese e secreção noturna de melatonina pineal frente ao exercício pode ser esperada (Marrin et al., 2011).

6.4 Níveis séricos de citocinas inflamatórias

Diversos estudos indicam que infecções dentárias, como a PA, podem potencializar a patogênese de doenças autoimunes, principalmente por aumentar a infiltração de células inflamatórias e os níveis de citocinas séricas (Cintra et al., 2018, 2014b, 2014a; Cotti et al., 2011).

Neste estudo, o impacto do estresse na saúde sistêmica dos animais com PA foi avaliado através da quantificação dos níveis séricos de citocinas inflamatórias também através do imunoensaio multiplex. No entanto, não houve diferenças estatísticas entre os grupos controle NS e SS em relação aos níveis séricos das citocinas inflamatórias avaliadas (IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF-alfa). Na comparação entre os grupos estressados, apenas a IL-10 se mostrou significativamente mais alta no grupo SF em comparação ao grupo SP.

Cintra et al. (2016) mostraram um aumento nos níveis séricos de IL-6, IL-17, IL-23 e TNF-alfa de ratos com múltiplos focos de infecção endodôntica. Um ponto importante a ser considerado é que, na presente pesquisa, não foi incluído nenhum grupo completamente saudável, ou seja, livre de estresse e lesão periapical. Portanto, embora o estresse não tenha sido capaz de aumentar os níveis de citocinas séricas *per se*, podemos pressupor que em todos os grupos a inflamação sistêmica poderia estar presente, considerando que assim como no estudo Cintra et al. (2016) os animais tiveram os 4 molares expostos na cavidade bucal. Vale ressaltar que no grupo SF os níveis séricos da IL-10 se apresentaram mais acentuados quando comparados aos demais grupos. Este resultado corrobora com achados na literatura que sugerem que a Fluoxetina exerce um efeito benéfico na recuperação neurológica sensorial mediado pela manutenção da produção de citocina anti-inflamatória IL-10 (Blatteau et al., 2015; Kubera et al., 2001). A IL-10 representa uma família de citocinas que inibe a inflamação e as respostas imunológicas (Kwilasz et al., 2015). Sugere-se que a eficácia antidepressiva dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina, como a Fluoxetina, pode estar relacionada aos seus efeitos imunorreguladores, aumentando a produção de IL-10 por leucócitos no sangue periférico e suprimindo a proporção na produção de IFN- γ para IL-10 (Kubera et al., 2009, 2001; Maes, 2001; Ohgi et al., 2013).

6.5 Avaliação histológica e microtomográfica da lesão periapical

Os efeitos do estresse crônico na resposta inflamatória e na reabsorção óssea na PA induzida em ratos já foram relatados em estudos anteriores (Gomes et al., 2019; Khoury et al., 2020; Minhoto et al., 2021). Os achados histológicos observados nesta pesquisa, que foram avaliados 21 dias após a exposição pulpar, são consistentes com os reportados por Minhoto et al. (2021). Histologicamente, os animais expostos ao estresse crônico imprevisível tiveram uma PA mais severa comparada ao grupo controle não-estressado, apresentando maiores escores de intensidade e extensão do infiltrado inflamatório, bem como uma maior área de perda óssea. A intensidade significativa da inflamação observada nos grupos estressados é compatível com vários estudos em animais e humanos que demonstraram a exacerbação de várias condições inflamatórias crônicas causadas pelo estresse (Black, Garbutt, 2002; Kemeny, Schedlowski, 2007).

Além disso, no presente estudo, a reabsorção óssea foi monitorada através de uma análise microtomográfica detalhada da proporção de volume ósseo/volume tecidual da área da lesão periapical no terço apical da raiz distal. A micro-CT, é um método de alta resolução, precisão e bem documentado que fornece uma quantificação tridimensional precisa da perda óssea periapical (Khoury et al., 2020; Michetti et al., 2010). De forma semelhante aos achados histológicos, a análise por micro-CT revelou maiores volumes de perda óssea periapical no grupo controle estressado. Este dado está de acordo com o estudo de Minhoto et al. (2021), no qual o volume de reabsorção óssea também foi avaliado por meio de micro-CT. Os autores reportaram uma perda óssea significativa nos animais estressados com 21 dias de exposição pulpar. Embora Gomes et al. (2019) não tenham relatado diferenças significantes em relação à perda óssea entre animais estressados e não estressados, os autores utilizaram radiografia convencional, que não reflete a real extensão do processo destrutivo e geralmente subestima o tamanho das lesões periapicais (Jorge et al., 2008; de Paula-Silva et al., 2009). Além disso, no estudo de Gomes et al. (2019), os autores avaliaram um período relativamente longo (60 dias) de desenvolvimento das lesões periapicais. Vale ressaltar que a destruição óssea é muito extensa em longos períodos de avaliação e isso pode ter dificultado a medição precisa das lesões periapicais (Xu et al., 2019). Khoury et al. (2020) também

observaram a ausência de diferenças significativas na perda óssea periapical entre animais estressados e não estressados. Porém, apesar do uso de micro-CT, os autores relataram que a PA foi induzida 4 dias antes do início da aplicação do estresse. Nesse caso, pode-se supor que a PA foi avaliada em um organismo no qual a condição de estresse crônico ainda não havia sido totalmente estabelecida, o que pode explicar a ausência de achados significativos pelos autores.

6.6 Avaliação da expressão gênica de biomarcadores da reabsorção óssea e citocinas inflamatórias por RT-PCR

A lesão periapical é causada pela interação de fatores microbianos e defesa do hospedeiro na interface entre o canal radicular infectado e o ligamento periodontal (Nair, 2004). Essa interação resulta no recrutamento de células inflamatórias, na produção de citocinas e enzimas líticas, e na ativação de osteoclastos, causando inflamação local e destruição de tecidos periapicais mineralizados e não mineralizados, incluindo colágeno e outros componentes da matriz extracelular (Hannas et al., 2007; Nair, 2004; Stashenko et al., 1998).

Com o objetivo de compreender melhor a influência que o estresse poderia exercer sobre os mecanismos moleculares e celulares que regulam a progressão da lesão periapical, bem como o efeito da Fluoxetina e propranolol, a expressão de determinadas citocinas inflamatórias e moléculas relacionadas a destruição dos tecidos periapicais foram avaliadas através de RT-PCR.

A PCR em tempo real se tornou o padrão para a análise da expressão gênica de mRNA de um número limitado de genes. Dada sua grande faixa dinâmica de quantificação linear, alta velocidade, sensibilidade (baixa entrada de modelo necessária) e resolução (pequenas diferenças podem ser medidas), este método é perfeitamente adequado para validação de resultados de triagem de expressão de “microarranjos” de DNA em um painel de amostra independente e maior, e para estudos com um número selecionado de genes-alvos ou constitutivos de um determinado desenho experimental.

No entanto, uma das etapas mais importantes em RT-PCR é a escolha de

um método de normalização adequado. O melhor e mais comum método utilizado para a análise de mudanças relativas na expressão de mRNA de genes alvo é a quantificação paralela de genes de referência padrão. O gene de referência ou controle endógeno é qualquer gene que não altere seu nível de expressão em todas as amostras do estudo, sendo utilizado para normalizar as quantidades dos genes alvos numa quantificação relativa de expressão gênica. Na maioria das vezes, genes constitutivos ou de referência são essenciais para a manutenção das funções celulares básicas, metabolismo, crescimento e multiplicação de qualquer tipo de célula (Suzuki et al., 2000).

Essa estratégia visa eliminar a variação introduzida pelo processamento pré-PCR e PCR. No entanto, foi demonstrado que nenhum gene de referência é verdadeiramente expresso de forma estável em todos os tipos de condições de cultura ou entre diferentes tipos de células. Assim, é recomendável sempre usar pelo menos dois genes de referência, a fim de evitar erros substanciais (Bustin et al., 2009; Nicot et al., 2005). Além disso, é aconselhável uma avaliação cuidadosa dos genes de referências empregados antes do experimento em si, para a determinação do gene de referência mais apropriado, uma vez que os níveis de transcrição podem variar muito entre os diferentes tecidos e sob diferentes condições experimentais. Para isso, programas de software, como geNorm, BestKeeper e NormFinder, foram desenvolvidos para realizar a normalização de dados, que auxiliam na escolha do gene de referência mais estável (Rebouças et al., 2013).

Revendo a literatura em pesquisa odontológica, o gene de referência mais comumente utilizado tem sido a β -actina. Kalatzis-Sousa et al. (2014) utilizaram β -actina em amostra de tecido correspondente às raízes de molar inferior (incluindo polpa radicular) e estruturas circundantes (osso, ligamento periodontal) de camundongos. Wu et al. (2013) também utilizaram β -actina em células do ligamento periodontal de humanos. Menezes et al. (2008b) usaram β -actina em amostras que consistiam em granulomas periapicais, cistos e ligamento periodontal. Da mesma forma, Zivanovic et al. (2021) utilizaram β -actina em lesões periapicais de ratos e por fim, apenas o estudo de Matsui et al. (2011) avaliaram o nível de expressão gênica em lesões periapicais de ratos utilizando o GAPDH como gene de referência. Vale ressaltar que nenhum dos estudos acima escolheu o gene de referência testando um painel de possíveis genes de referências nas amostras examinadas. A literatura

revisada sobre os diversos estudos relacionados a lesões inflamatórias periapicais, demonstra que poucos deles utilizam qPCR, e nenhum deles menciona a realização de um teste para determinação de gene de referência que seja mais apropriado antes de conduzir um experimento. Na presente pesquisa, três diferentes genes de referência, GAPDH, β -actina e B2M, foram previamente testados e após análise em software específico o gene GAPDH foi escolhido como o gene constitutivo mais apropriado para as amostras aqui utilizadas.

Os resultados obtidos em relação à quantidade e pureza do RNA extraído (relação 260/280 nm) mostraram que todas as amostras eram satisfatórias para o processo de transcrição reversa confirmando que o RNA total extraído de amostras do tecido periapical não estava completamente degradado e ainda pôde ser usado para análise quantitativa de PCR. Sabe-se que os *primers* que geram amplicons longos em comparação com os curtos não levam a uma alta eficiência de amplificação quando o RNA é extraído de amostras ósseas. Portanto, para maximizar o sucesso na amplificação de RNA que poderia estar levemente degradado, escolhemos amplificar sequências curtas, com comprimentos de 80-200 pares de bases.

As citocinas desempenham um papel importante nas respostas inflamatórias e imunológicas relacionadas ao metabolismo ósseo. Inúmeros estudos já demonstraram a produção de citocinas em lesões periapicais e o equilíbrio entre mediadores pró e anti-inflamatórios é determinante para o resultado da reabsorção em doenças caracterizadas pela destruição óssea, incluindo a PA (Čolić et al., 2009; Danin et al., 2000; Silva et al., 2007).

A IL-6 é uma citocina que desempenha um papel fundamental nas respostas imunológicas sendo considerada uma citocina pró e anti-inflamatória. Sua produção ocorre durante a inflamação e após a secreção do TNF-alfa e da IL-1. Esta interleucina é uma citocina multifuncional sintetizada em resposta a estímulos como infecção e trauma (Kishimoto et al., 1995) por uma variedade de células como macrófagos, neutrófilos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais (Matsuki et al., 1992). De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, a expressão gênica das citocinas IL-6, IL-10 e IL-17 estavam significativamente mais altas nos grupos de ratos estressados em relação ao grupo controle NS. A comparação entre os grupos estressados indicou que todos os grupos medicados foram capazes de inibir a

expressão de IL-6 e IL-10, com exceção do grupo SF que ainda assim apresentou uma expressão elevada de IL-10, que é considerada uma citocina anti-inflamatória. Por outro lado, ambos os grupos SF e SP apresentaram uma inibição significativa da IL-17, que é uma citocina pró-inflamatória associada à manutenção da integridade tecidual sendo que o nível desregulado de IL-17 pode levar a hiper inflamação (Xiong et al., 2019). Dessa forma, a superprodução patológica de IL-17 pode desencadear inflamações excessivas culminando em lesões teciduais significativas, além de atuar sinergicamente com outras citocinas inflamatórias, como TNF-alfa, IL-1 β e IFN- γ , que levam à regulação positiva de mediadores inflamatórios, como IL-6 e IL-8 (Chen, Kolls, 2017). Além disso, a IL-17 regulada positivamente promove a resposta inflamatória local e induz a produção de RANKL, destacando, assim, a significância dos efeitos da IL-17 na perda óssea inflamatória (Chakravarti et al., 2009; Gaffen, 2004). Verificou-se, no entanto, que a associação da Fluoxetina e propranolol pareceu não surtir efeito na expressão dessa citocina quando comparada relativamente aos grupos controle SS.

Os mecanismos moleculares relacionados à reabsorção óssea são controlados principalmente pela interação entre o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL), o receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK) e a osteoprotegerina (OPG), que juntos representam a principal via de sinalização responsável pela regulação da ativação e diferenciação osteoclástica (Belibasakis et al., 2013). O RANKL, é expresso pelos osteoblastos e seus precursores imaturos, e a sua presença é fundamental para a diferenciação e função dos osteoclastos. O RANKL ativa o seu receptor - o RANK, expresso na superfície de osteoclastos e seus precursores, promovendo a maturação e ativação dos osteoclastos através do aumento da expressão de genes específicos que prolongam a sua sobrevivência ao diminuir a ocorrência de apoptose (Alliston, Derynck, 2002). A interação RANK-RANKL é por sua vez, contra-regulada pela OPG, uma proteína expressa pelos osteoblastos que atua como receptor de atração para RANKL, regulando negativamente a diferenciação dos osteoclastos, limitando assim a reabsorção óssea (Graves et al., 2011). Portanto, o aumento na expressão de RANKL e a redução na expressão de OPG, ou seja, uma razão desequilibrada entre essas moléculas, tem sido relacionada à progressão da reabsorção óssea periapical (Carneiro et al., 2017; Menezes et al., 2008a; Nakashima et al., 2000; Salinas-Muñoz

et al., 2017). Além disso, estudos prévios relacionaram o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) -1 β e IL-6, com o período de reabsorção óssea ativa, demonstrando que tais citocinas podem estimular osteoclastogênese e reabsorção óssea alveolar tanto diretamente quanto indiretamente através da produção de RANKL por osteoblastos em tecidos periapicais (Brito et al., 2012; Gazivoda et al., 2009; Jakovljevic et al., 2015; Wang et al., 1997). Tais estudos reforçam os achados nesta pesquisa que demonstrou o aumento da expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-17 nos grupos de animais estressados, também associados ao um maior volume de reabsorção óssea periapical.

Uma maior expressão de TRAP foi observada no grupo controle estressado SS em relação ao grupo NS. Uma vez que a TRAP está envolvida em diversos processos como a síntese e degradação de colágeno (Hayman, 2008), a maior expressão de TRAP pode ser parcialmente explicada pela expressão, também significativamente mais alta de RANKL no grupo SS. O RANKL é o regulador positivo para a osteoclastogênese e a OPG atua como um fator inibidor, ligando-se ao RANK e impedindo a ligação RANK-RANKL (Boyce, Xing, 2008). Dessa forma, a sequência de eventos fundamentais para a formação do osteoclasto é impedida. Neste estudo, os valores de OPG permaneceram semelhantes em ambos os grupos, NS e SS, e a menor expressão de RANKL no grupo não estressado, explica também a expressão atenuada de mRNA de TRAP.

Além disso, também foi observado que o grupo que recebeu administrações diárias da associação de Fluoxetina e Propranolol (SFP), apresentou expressão gênica atenuada de RANKL e TRAP, enquanto os grupos SF e SP apresentaram efeitos moduladores positivos sobre a expressão gênica de OPG. Estes dados reforçam os dados obtidos pela análise de micro-CT na qual o grupo SFP também apresentou os menores valores de volume de lesão periapical.

De acordo com nossos resultados, a administração de um bloqueador beta-adrenérgico pode prevenir a perda óssea periapical por diminuir a reabsorção óssea, conforme demonstrados por outros estudos na área da periodontia (Okada et al., 2010; Rodrigues et al., 2012). Rodrigues et al. (2012) sugerem que os efeitos de bloqueadores adrenérgicos no metabolismo ósseo são parcialmente devidos à inibição de marcadores inflamatórios e da osteoclastogênese, que também foram

observados na presente pesquisa.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são um importante grupo de enzimas proteolíticas que desempenham um papel central na degradação da matriz extracelular (Broverman et al., 1998). As MMPs consistem em cinco subgrupos: colagenases, gelatinases, estromelisinases, MMPs do tipo membrana e outras MMPs. Matsui et al. (2011) investigaram as expressões de MMPs em lesões perirradiculares de ratos induzidas experimentalmente e demonstraram que tanto a MMP-8 quanto a MMP-13 existem em lesões periapicais de ratos. Segundo os autores, os níveis de expressão de MMP-8 e MMP-13 aumentaram com a expansão da área da lesão.

No presente estudo, a expressão de mRNA da MMP-8 foi significativamente maior no grupo controle SS comparado ao grupo controle não estressado NS. Por outro lado, não houve diferenças significativas entre os grupos controle NS e SS em relação a expressão de mRNA da MMP-13. No entanto, vale notar que os grupos SP e SFP apresentaram o mesmo efeito sobre ambas as MMPs avaliadas demonstrando uma expressão gênica mais atenuada destas enzimas quando comparadas ao grupo SS. De acordo com o estudo de Matsui et al. (2011), a expressão de MMP-13 foi observada em um estágio anterior à expressão de MMP-8, sugerindo que a MMP-13 iniciou o desenvolvimento das lesões perirradiculares e que a MMP-8 estava relacionada à sua expansão. Baseados nestes dados, podemos supor que o estresse não exerceu influência durante o início do desenvolvimento das lesões, mas sim na sua expansão, visto que o grupo estressado expressou maiores níveis de mRNA de MMP-8.

Por fim, verificou-se neste trabalho que o estresse crônico influencia o desenvolvimento da lesão periapical uma vez que diferentes marcadores são afetados durante esse processo. O modelo animal de estresse utilizado demonstrou alterações pertinentes no ganho de peso dos animais, acompanhado de níveis elevados de ACTH, culminando na exacerbação da inflamação e no agravamento da perda óssea periapical, observadas tanto histologicamente como por micro-CT. Biomarcadores como RANKL e TRAP relacionados a atividade osteoclástica também se mostraram alterados no grupo controle estressado. Em relação às MMPs que tem primordial participação na remodelação óssea, na reabsorção e no reparo, durante o estresse verificou-se que a MMP-8 estava aumentada, o que se mostrou bastante coerente com os demais resultados uma vez que essa MMP inicia a

degradação do colágeno e promove a atividade e diferenciação dos osteoclastos (Kou et al., 2021). Ainda, foram testados os efeitos dos medicamentos, Propranolol e Fluoxetina, a fim de “modular” o estresse. O Propranolol, β -bloqueador, que tem ação anti-hipertensiva bem reconhecida e potencial efeito na remodelação óssea, nesse estudo mostrou aumentar os níveis de melatonina e diminuir os níveis de ACTH culminando com diminuição do volume da lesão periapical e do infiltrado inflamatório, reflexo do aumento nos níveis de OPG, substância osteoprotetora. Ainda foi testado a Fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação da serotonina (ISRS), amplamente utilizado para tratar transtornos depressivos, verificando que seu efeito aumentou IL-10 e OPG com consequente diminuição do volume da lesão periapical. Ao associar Fluoxetina com o Propranolol verificou-se diminuição na expressão de TRAP e RANKL com consequente diminuição do volume da lesão periapical e diminuição da intensidade e extensão do processo inflamatório periapical. Sendo assim, o estresse favorece o desenvolvimento de lesões ósseas devido a infecção no canal radicular, no entanto estratégias terapêuticas com uso de substâncias moduladoras da destruição óssea podem indicar uma nova perspectiva no tratamento da periodontite apical associada a terapia local adequada. Resta agora saber a influência do estresse no reparo periapical após tratamento endodôntico bem como o uso de terapias sistêmicas associadas.

7 CONCLUSÃO

Foi concluído a partir da presente pesquisa que o estresse crônico influenciou negativamente a patogênese da PA e que ambas as medicações avaliadas, bem como suas associações tiveram efeitos positivos na prevenção da perda óssea e modulação inflamatória.

REFERÊNCIAS*

- Abdel-Salam OME, Nofal SM, El-Shenawy SM. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of different antidepressants in the rat. *Pharmacol Res.* 2003;48(2):157–65. PMID: 12798668.
- Ader R, Cohen N, Felten D. Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *Lancet (London, England).* 1995;345(8942):99–103. PMID: 7815892.
- Aguiar JCA, Gomes EPP, Fonseca-Silva T, Velloso NA, Vieira LT, Fernandes MF, et al. Fluoxetine reduces periodontal disease progression in a conditioned fear stress model in rats. *J Periodontal Res.* 2013;48(5):632–7. doi: 10.1111/jre.12049. PMID: 23425324.
- Alliston T, Derynck R. Interfering with bone remodelling. *Nature.* 2002;416(6882):686–7. doi: 10.1038/416686a. PMID: 11961535.
- American Psychological Association [Internet]. Stress in America [cited 2021 Jan 15]. Available from: <https://www.apa.org/news/press/releases/stress/2012/full-report.pdf>.
- Ardila CM, Guzmán IC. Association of *Porphyromonas gingivalis* with high levels of stress-induced hormone cortisol in chronic periodontitis patients. *J Investig Clin Dent.* 2016;7(4):361–7. doi: 10.1111/jicd.12175. PMID: 26194628.
- Armario A, Escorihuela R, Nadal R. Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure to stress in adult animals. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32(6):1121–35. doi: 10.1016/J.NEUBIOREV.2008.04.003. PMID: 18514314.
- Arya S, Duhan J, Tewari S, Sangwan P, Ghalaut V, Aggarwal S. Healing of apical periodontitis after nonsurgical treatment in patients with type 2 diabetes. *J Endod.* 2017;43(10):1623–7. doi: 10.1016/J.JOEN.2017.05.013. PMID: 28803674.
- Aydin H, Mutlu N, Akbas NGB. Treatment of a major depression episode suppresses markers of bone turnover in premenopausal women. *J Psychiatr Res.* 2011;45(10):1316–20. doi: 10.1016/j.jpsychires.2011.04.005.
- Ayensu WK, Pucilowski O, Mason GA, Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS. Effects of chronic mild stress on serum complement activity, saccharin preference, and corticosterone levels in Flinders lines of rats. *Physiol Behav.* 1995;57(1):165–9. doi: 10.1016/0031-9384(94)00204-I.
- Azuma MM, Gomes-Filho JE, Prieto AKC, Samuel RO, de Lima VMF, Sumida DH, et al. Diabetes increases interleukin-17 levels in periapical, hepatic, and renal tissues in rats. *Arch Oral Biol.* 2017;83:230–5. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.08.001. PMID: 28818706.
- Bachis A, Cruz M, Nosheny R, Mocchetti I. Chronic unpredictable stress promotes neuronal apoptosis in the cerebral cortex. *Neurosci Lett.* 2008;442(2):104–8. doi:

10.1016/J.NEULET.2008.06.081. PMID: 18621098.

Bakri I, Douglas CWI, Rawlinson A. The effects of stress on periodontal treatment: A longitudinal investigation using clinical and biological markers. *J Clin Periodontol*. 2013;40(10):955–61. doi: 10.1111/jcpe.12142. PMID: 23952266.

Bangsgaard E, Ottesen J. Patient specific modeling of the HPA axis related to clinical diagnosis of depression. *Math Biosci*. 2017;287:24–35. doi: 10.1016/J.MBS.2016.10.007. PMID: 27816534.

Bekhbat M, Glasper ER, Rowson S, Kelly SD, Neigh GN. Measuring corticosterone concentrations over a physiological dynamic range in female rats. *Physiol Behav*. 2018;194:73–6. doi: 10.1016/J.PHYSBEH.2018.04.033. PMID: 29730284.

Belibasakis GN, Rechenberg DK, Zehnder M. The receptor activator of NF- κ B ligand-osteoprotegerin system in pulpal and periapical disease. *Int Endod J*. 2013;46(2):99–111. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02105.x. PMID: 22900632.

Bertrand E, Smadja C, Mauborgne A, Roques BP, Daugé V. Social interaction increases the extracellular levels of [Met]enkephalin in the nucleus accumbens of control but not of chronic mild stressed rats. *Neuroscience*. 1997;80(1):17–20. doi: 10.1016/S0306-4522(97)00136-X.

Black P, Garbutt L. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res*. 2002;52(1):1–23. doi: 10.1016/S0022-3999(01)00302-6. PMID: 11801260.

Black PH. Central nervous system-immune system interactions: psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(1):1–6. PMID: 8141561.

Blatteau J-E, de Maistre S, Lambrechts K, Abraini J, Risso J-J, Vallée N. Fluoxetine stimulates anti-inflammatory IL-10 cytokine production and attenuates sensory deficits in a rat model of decompression sickness. *J Appl Physiol*. 2015;119(12):1393–9. doi: 10.1152/japplphysiol.00602.2015.

Bliziotis M, Gunness M, Eshleman A, Wiren K. The role of dopamine and serotonin in regulating bone mass and strength: studies on dopamine and serotonin transporter null mice. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2002;2(3):291–5. PMID: 15758457.

Blossom V, Gokul M, Kumar N, Kini R, Nayak S, Bhagyalakshmi K. Chronic unpredictable stress-induced inflammation and quantitative analysis of neurons of distinct brain regions in Wistar rat model of comorbid depression. *Vet World*. 2020;13(9):1870–4. doi: 10.14202/VETWORLD.2020.1870-1874. PMID: 33132599.

Bonnet N, Bernard P, Beaupied H, Bizot JC, Trovero F, Courteix D, et al. Various effects of antidepressant drugs on bone microarchitecture, mechanical properties and bone remodeling. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;221(1):111–8. doi: 10.1016/j.taap.2007.02.005. PMID: 17383703.

Boyapati L, Wang H-LL. The role of stress in periodontal disease and wound healing. *Periodontol 2000*. 2007;44(1):195–210. doi: 10.1111/j.1600-0757.2007.00211.x.

PMID: 17474934.

Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):139–46. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.018. PMID: 18395508.

Branco-de-Almeida LS, Franco GC, Castro ML, Dos Santos JG, Anbinder AL, Cortelli SC, et al. Fluoxetine inhibits inflammatory response and bone loss in a rat model of ligature-induced periodontitis. *J Periodontol*. 2012;83(5):664–71. doi: 10.1902/jop.2011.110370. PMID: 21966942.

Brandish PE, Anderson K, Baltus GA, Bai C, Bungard CJ, Bunting P, et al. The preclinical efficacy, selectivity and pharmacologic profile of MK-5932, an insulin-sparing selective glucocorticoid receptor modulator. *Eur J Pharmacol*. 2014;724:102–11. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.12.031.

Brismar K, Hylander B, Eliasson K, Rössner S, Wetterberg L. Melatonin secretion related to side-effects of β -blockers from the central nervous system. *Acta Med Scand*. 2009;223(6):525–30. doi: 10.1111/j.0954-6820.1988.tb17690.x.

Brito L, Teles F, Teles R, Totola A, Vieira L, Sobrinho A. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. *J Endod*. 2012;38(4):481–5. doi: 10.1016/j.joen.2011.12.010. PMID: 22414833.

Broverman RL, Nguyen K-HT, da Silveira A, Brinkley LL, Macauley SP, Zeng T, et al. Changes in the expression of extracellular matrix (ECM) and matrix metalloproteinases (MMP) of proliferating rat parotid acinar cells. *J Dent Res*. 1998;77(7):1504–14. doi: 10.1177/00220345980770070501.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time pcr experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611–22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.

Buxton OM, Lee CW, L'Hermite-Balériaux M, Turek FW, Van Cauter E. Exercise elicits phase shifts and acute alterations of melatonin that vary with circadian phase. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2003;284(3):R714–24. doi: 10.1152/ajpregu.00355.2002.

Calil HM. Fluoxetine: a suitable long-term treatment. *J Clin Psychiatry*. 2001;62 Suppl 2:24–9. PMID: 11599644.

Carneiro E, Parolin AB, Wichnieski C, Rosa EAR, Silva Neto UX, Westphalen VPD, et al. Expression levels of the receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin and the number of gram-negative bacteria in symptomatic and asymptomatic periapical lesions. *Arch Oral Biol*. 2017;73:166–71. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.10.004. PMID: 27771584.

Castro MML, Ferreira R de O, Fagundes NCF, Almeida APCPSC, Maia LC, Lima RR. Association between psychological stress and periodontitis: a systematic review. *Eur J Dent*. 2020;14(1):171–9. doi: 10.1055/s-0039-1693507. PMID: 32069501.

Cavigelli SA, Bao AD, Bourne RA, Caruso MJ, Caulfield JI, Chen M, et al. Timing matters: the interval between acute stressors within chronic mild stress modifies behavioral and physiologic stress responses in male rats. *Stress*. 2018;21(5):453–63. doi: 10.1080/10253890.2018.1459557.

Chakravarti A, Raquil M-A, Tessier P, Poubelle PE. Surface RANKL of Toll-like receptor 4–stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood*. 2009;114(8):1633–44. doi: 10.1182/blood-2008-09-178301.

Chang K, Lu L. Characteristics of organizational culture, stressors and wellbeing: The case of Taiwanese organizations. *J Manag Psychol*. 2007;22(6):549–68. doi: 10.1108/02683940710778431.

Chen K, Kolls JK. Interleukin-17A (IL17A). *Gene*. 2017;614:8–14. doi: 10.1016/j.gene.2017.01.016.

Chojnacki C, Walecka-Kapica E, Klupinska G, Pawlowicz M, Blonska A, Chojnacki J. Effects of fluoxetine and melatonin on mood, sleep quality and body mass index in postmenopausal women - PubMed. *J Physiol Pharmacol*. 2015;66(5):665–71. PMID: 26579572.

Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*. 1995;332(20):1351–62. doi: 10.1056/NEJM199505183322008. PMID: 7715646.

Cintra LTA, Estrela C, Azuma MM, Queiroz IOA, Kawai T, Gomes-Filho JE. Endodontic medicine: Interrelationships among apical periodontitis, systemic disorders, and tissue responses of dental materials. *Braz Oral Res*. 2018;32(suppl 1):66–81. doi: 10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0068. PMID: 30365609.

Cintra LTA, Samuel RO, Azuma MM, Queiróz IAO, Ervolino E, Sumida DH, et al. Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. *J Endod*. 2016;42(5):747–51. doi: 10.1016/J.JOEN.2016.01.022. PMID: 27059651.

Cintra LTA, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, de Lima VMF, et al. Apical periodontitis and periodontal disease increase serum IL-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. *Clin Oral Investig*. 2014a;18(9):2123–8. doi: 10.1007/s00784-014-1192-7. PMID: 24464218.

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

Čolić M, Gazivoda D, Vučević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol*. 2009;47(1):101–13. doi: 10.1016/j.molimm.2009.01.011.

Cosme-Silva L, Dal-Fabbro R, Cintra LTA, Ervolino E, Piazza F, Bomfim SM, et al. Reduced bone resorption and inflammation in apical periodontitis evoked by dietary supplementation with probiotics in rats. *Int Endod J*. 2020;53(8):1084–92. doi: 10.1111/IEJ.13311. PMID: 32436602.

Cosme-Silva L, Dal-Fabbro R, Cintra LTA, dos Santos VR, Duque C, Ervolino E, et al. Systemic administration of probiotics reduces the severity of apical periodontitis. *Int Endod J*. 2019;52(12):1738–49. doi: 10.1111/iej.13192.

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

Curzon G, Gibson E, Oluyomi A. Appetite suppression by commonly used drugs depends on 5-HT receptors but not on 5-HT availability. *Trends Pharmacol Sci*. 1997;18(1):21–5. doi: 10.1016/S0165-6147(96)01003-6. PMID: 9114726.

Cutolo M, Maestroni GJ. The melatonin-cytokine connection in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(8):1109–11. doi: 10.1136/ARD.2005.038588. PMID: 16014678.

Dai J, Pan JY, Liao N, Shi J, Zeng Q, Huang L, et al. Influence of miR-155 on behaviors of depression mice through regulating Wnt/-catenin signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(3):1398–407. doi: 10.26355/eurrev_202002_20197. PMID: 32096189.

Dal-Fabbro R, Marques-de-Almeida M, Cosme-Silva L, Ervolino E, Cintra LTA, Gomes-Filho JE. Chronic alcohol consumption increases inflammation and osteoclastogenesis in apical periodontitis. *Int Endod J*. 2019;52(3):329–36. doi: 10.1111/iej.13014. PMID: 30218448.

Danin J, Linder LE, Lundqvist G, Andersson L. Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1 in chronic periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2000;90(4):514–7. doi: 10.1067/moe.2000.108958.

Dhabhar FS. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(5):300–17. doi: 10.1159/000216188. PMID: 19571591.

Dhabhar FS. Stress-induced augmentation of immune function--the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain Behav Immun*. 2002;16(6):785–98. PMID: 12480507.

Dhabhar FS, Malarkey WB, Neri E, McEwen BS. Stress-induced redistribution of immune cells-From barracks to boulevards to battlefields: A tale of three hormones - Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(9):1345–68. doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.05.008. PMID: 22727761.

Dhabhar FS, McEwen BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: A potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun*. 1997;11(4):286–306. doi: 10.1006/brbi.1997.0508. PMID: 9512816.

Dhabhar FS, Saul AN, Daugherty C, Holmes TH, Bouley DM, Oberyshyn TM. Short-term stress enhances cellular immunity and increases early resistance to squamous cell carcinoma. *Brain Behav Immun*. 2010;24(1):127–37. doi:

10.1016/j.bbi.2009.09.004. PMID: 19765644.

Dionisie V, Filip GA, Manea MC, Manea M, Riga S. The anti-inflammatory role of SSRI and SNRI in the treatment of depression: a review of human and rodent research studies. *Inflammopharmacology*. 2020. doi: 10.1007/s10787-020-00777-5.

Färkkilä E, Rautemaa-Richardson R, Färkkilä A, Grönholm L, Lauhio A. Evaluation of risk factors for oral infection with potential for spread in a 1-year cohort study. *Clin Oral Investig*. 2019;23(2):905–11. doi: 10.1007/s00784-018-2518-7. PMID: 29948280.

Fox MA, Andrews AM, Wendland JR, Lesch K-P, Holmes A, Murphy DL. A pharmacological analysis of mice with a targeted disruption of the serotonin transporter. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007;195(2):147–66. doi: 10.1007/s00213-007-0910-0. PMID: 17712549.

Francisconi CF, Vieira AE, Biguetti CC, Glowacki AJ, Trombone APF, Letra A, et al. Characterization of the protective role of regulatory T cells in experimental periapical lesion development and their chemoattraction manipulation as a therapeutic tool. *J Endod*. 2016;42(1):120–6. doi: 10.1016/j.joen.2015.09.022. PMID: 26589811.

Frick LR, Barreiro Arcos ML, Rapanelli M, Zappia MP, Brocco M, Mongini C, et al. Chronic restraint stress impairs T-cell immunity and promotes tumor progression in mice. *Stress*. 2009;12(2):134–43. doi: 10.1080/10253890802137437. PMID: 18609297.

Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24(1):25–31. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00469.x. PMID: 19121066.

Fuller RW, Snoddy HD. Fluoxetine enantiomers as antagonists of p-chloroamphetamine effects in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1986;24(2):281–4. doi: 10.1016/0091-3057(86)90351-5.

Gaffen SL. Biology of recently discovered cytokines: interleukin-17--a unique inflammatory cytokine with roles in bone biology and arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2004;6(6):240–7. doi: 10.1186/ar1444.

García-Iglesias BB, Mendoza-Garrido ME, Gutiérrez-Ospina G, Rangel-Barajas C, Noyola-Díaz M, Terrón JA. Sensitization of restraint-induced corticosterone secretion after chronic restraint in rats: involvement of 5-HT₇ receptors. *Neuropharmacology*. 2013;71:216–27. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.03.013. PMID: 23542440.

Gazivoda D, Dzopalic T, Bozic B, Tatomirovic Z, Brkic Z, Colic M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *J Oral Pathol Med*. 2009;38(7):605–11. doi: 10.1111/j.1600-0714.2009.00788.x. PMID: 19453841.

Gebara MA, Shea MLOO, Lipsey KL, Teitelbaum SL, Civitelli R, Müller DJ, et al. Depression, antidepressants, and bone health in older adults: a systematic review. *J*

Am Geriatr Soc. 2014;62(8):1434–41. doi: 10.1111/jgs.12945. PMID: 25039259.

Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontol* 2000. 2007;43(1):14–40. doi: 10.1111/j.1600-0757.2006.00173.x. PMID: 17214833.

Ghosh S, Choudhury S, Chowdhury O, Mukherjee S, Das A, Sain A, et al. Inflammation-induced behavioral changes is driven by alterations in Nrf2-dependent apoptosis and autophagy in mouse hippocampus: role of fluoxetine. *Cell Signal*. 2020;68. doi: 10.1016/j.cellsig.2019.109521. PMID: 31881324.

Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: Implications for health. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):243–51. doi: 10.1038/nri1571. PMID: 15738954.

Golub LM, Lee H-M, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res*. 1998;12(1):12–26. doi: 10.1177/08959374980120010501. PMID: 9972117.

Gomes-Filho JE, Wayama MT, Dornelles RCM, Ervolino E, Coclete GA, Duarte PCT, et al. Effect of raloxifene on periapical lesions in ovariectomized rats. *J Endod*. 2015;41(5):671–5. doi: 10.1016/j.joen.2014.11.027. PMID: 25576209.

Gomes ESB, Farias LC, Silveira LH, Jesus CÍ de, Rocha RG da, Ramos GV, et al. Conditioned fear stress increases bone resorption in apical periodontitis lesions in Wistar male rats. *Arch Oral Biol*. 2019;97:35–41.

Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, et al. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry*. 2008;13(7):717–28. doi: 10.1038/SJ.MP.4002055. PMID: 17700577.

Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 2011;3(1):5304. doi: 10.3402/jom.v3i0.5304. PMID: 21547019.

Grippo AJ, Francis J, Beltz TG, Felder RB, Johnson AK. Neuroendocrine and cytokine profile of chronic mild stress-induced anhedonia. *Physiol Behav*. 2005;84(5):697–706. doi: 10.1016/J.PHYSBEH.2005.02.011. PMID: 15885245.

Habib M, Shaker S, El-Gayar N, Aboul-Fotouh S. The effects of antidepressants “Fluoxetine and Imipramine” on vascular abnormalities and toll like receptor-4 expression in diabetic and non-diabetic rats exposed to chronic stress. *PLoS One*. 2015;10(3). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0120559. PMID: 25826421.

Haney EM, Warden SJ, Bliziotes MM. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on bone health in adults: time for recommendations about screening, prevention and management? *Bone*. 2010;46(1):13–7. doi: 10.1016/j.bone.2009.07.083. PMID: 19664737.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix

metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 2007;65(1):1–13. doi: 10.1080/00016350600963640.

Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity*. 2008;41(3):218–23. doi: 10.1080/08916930701694667.

Herman J, Adams D, Prewitt C. Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology*. 1995;61(2):180–90. doi: 10.1159/000126839. PMID: 7753337.

Herman J, McKlveen J, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, et al. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Compr Physiol*. 2016;6(2):603–21. doi: 10.1002/CPHY.C150015. PMID: 27065163.

Holsboer F, Barden N. Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev*. 1996;17(2):187–205. doi: 10.1210/EDRV-17-2-187. PMID: 8706631.

Holzhausen M, Rossa Júnior C, Marcantonio Júnior E, Nassar PO, Spolidório DMP, Spolidório LC. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2002;73(9):1030–6. doi: 10.1902/jop.2002.73.9.1030. PMID: 12296588.

Hong C, Chen L, Kong W, Zhang D, Wang L, Zhao J, et al. Behavioral and neurochemical changes in rats with recurrent depression induced by chronic unpredictable stress. *Neuro Endocrinol Lett*. 2021;42(6):387–94. PMID: 34713688.

Hou L -T, Liu C -M, Rossomando EF. Crevicular interleukin-1 β in moderate and severe periodontitis patients and the effect of phase I periodontal treatment. *J Clin Periodontol*. 1995;22(2):162–7. doi: 10.1111/j.1600-051X.1995.tb00128.x. PMID: 7775673.

Howait M, Albassam A, Yamada C, Sasaki H, Bahammam L, Azuma MM, 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):2035–43. doi: 10.4049/jimmunol.1801161.

Instituto de Psicologia e Controle do Stress [Internet]. Stress Brasil [cited 2021 Jan 15]. Available from: <http://www.estresse.com.br/pesquisa/stress-brasil/>.

Jakovljevic A, Knezevic A, Karalic D, Soldatovic I, Popovic B, Milasin J, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. *Aust Endod J*. 2015;41(2):72–7. doi: 10.1111/aej.12072. PMID: 25163634.

Jara C, Hartmann R, Böttcher D, Souza T, Gomes M, Figueiredo J. Influence of apical enlargement on the repair of apical periodontitis in rats. *Int Endod J*. 2018;51(11):1261–70. doi: 10.1111/IEJ.12949. PMID: 29737545.

Jiang P, Zhang W, Li H, Cai H, Liu Y, Chen L. Stress and vitamin D: altered vitamin

D metabolism in both the hippocampus and myocardium of chronic unpredictable mild stress exposed rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(10):2091–8. doi: 10.1016/J.PSYNEUEN.2013.03.017. PMID: 23608137.

Joëls M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(6):459–66. doi: 10.1038/nrn2632. PMID: 19339973.

Jorge EG, Tanomaru-Filho M, Gonçalves M, Tanomaru MJ. Detection of periapical lesion development by conventional radiography or computed tomography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106(1). doi: 10.1016/J.TRIPLEO.2008.03.020. PMID: 18585613.

José Jaime H-P, Venus B-C, Graciela J-R, Tania H-HO, Lucía M-M. Young-adult male rats' vulnerability to chronic mild stress is reflected by anxious-like instead of depressive-like behaviors. *Neurosci J*. 2016;2016:1–12. doi: 10.1155/2016/5317242.

Kalatzis-Sousa NG, Spin-Neto R, Wenzel A, Tanomaru-Filho M, Faria G. Use of micro-computed tomography for the assessment of periapical lesions in small rodents: a systematic review. *Int Endod J*. 2017;50(4):352–66. doi: 10.1111/iej.12633.

Karteva T, Manchorova-Veleva N. The role of the immune response in chronic marginal and apical periodontitis. *Folia Med (Plovdiv)*. 2020;62(2):238–43. doi: 10.3897/folmed.62.e39599. PMID: 32666754.

Kemeny ME, Schedlowski M. Understanding the interaction between psychosocial stress and immune-related diseases: a stepwise progression. *Brain Behav Immun*. 2007;21(8):1009–18. doi: 10.1016/j.bbi.2007.07.010. PMID: 17889502.

Khoury RD, Prado RF, Matos FS, Meireles BR, Cardoso FG da R, Oliveira LDL, et al. The influence of adrenergic blockade in rats with apical periodontitis under chronic stress conditions. *Arch Oral Biol*. 2020;110:104590. doi: 10.1016/J.ARCHORALBIO.2019.104590. PMID: 31743801.

Kinane DF, Demuth DR, Gorr SU, Hajishengallis GN, Martin MH. Human variability in innate immunity. *Periodontol 2000*. 2007;45(1):14–34. doi: 10.1111/j.1600-0757.2007.00220.x. PMID: 17850446.

Kirkevang LL, Wenzel A. Risk indicators for apical periodontitis. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2003;31(1):59–67. doi: 10.1034/j.1600-0528.2003.00032.x. PMID: 12542433.

Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*. 1995;86(4):1243–54. PMID: 7632928.

Klein DC, Sugden D, Weller JL. Postsynaptic alpha-adrenergic receptors potentiate the beta-adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci*. 1983;80(2):599–603. doi: 10.1073/pnas.80.2.599.

Konkle A, Baker S, Kentner A, Barbagallo L, Merali Z, Bielajew C. Evaluation of the effects of chronic mild stressors on hedonic and physiological responses: sex and

strain compared. *Brain Res.* 2003;992(2):227–38. doi: 10.1016/J.BRAINRES.2003.08.047. PMID: 14625061.

Koob G. Stress, corticotropin-releasing factor, and drug addiction. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;897:27–45. doi: 10.1111/J.1749-6632.1999.TB07876.X. PMID: 10676433.

Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000.* 1997;14(1):33–53. doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00191.x. PMID: 9567965.

Kou Y, Li C, Yang P, Li D, Lu X, Liu H, et al. The W9 peptide inhibits osteoclastogenesis and osteoclast activity by downregulating osteoclast autophagy and promoting osteoclast apoptosis. *J Mol Histol.* 2021. doi: 10.1007/s10735-021-10030-0.

Kubera M, Lin A-H, Kenis G, Bosmans E, van Bockstaele D, Maes M. Anti-inflammatory effects of antidepressants through suppression of the interferon- γ /interleukin-10 production ratio. *J Clin Psychopharmacol.* 2001;21(2):199–206. doi: 10.1097/00004714-200104000-00012.

Kubera M, Maes M, Budziszewska B, Basta-Kaim A, Lešekiewicz M, Grygier B, et al. Inhibitory effects of amantadine on the production of pro-inflammatory cytokines by stimulated in vitro human blood. *Pharmacol Reports.* 2009;61(6):1105–12. doi: 10.1016/S1734-1140(09)70173-2.

Kvarta M, Bradbrook K, Dantrassy H, Bailey A, Thompson S. Corticosterone mediates the synaptic and behavioral effects of chronic stress at rat hippocampal temporoammonic synapses. *J Neurophysiol.* 2015;114(3):1713–24. doi: 10.1152/JN.00359.2015. PMID: 26180121.

Kwilasz AJ, Grace PM, Serbedzija P, Maier SF, Watkins LR. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. *Neuropharmacology.* 2015;96:55–69. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.10.020.

Lee S, Remark LH, Buchalter DB, Josephson AM, Wong MZ, Litwa HP, et al. Propranolol reverses impaired fracture healing response observed with selective serotonin reuptake inhibitor treatment. *J Bone Miner Res.* 2020;35(5):932–41. doi: 10.1002/jbmr.3950. PMID: 31881108.

Leitão RFC, Ribeiro RA, Chaves H V, Rocha FAC, Lima V, Brito GAC. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2005;76(6):956–63. doi: 10.1902/jop.2005.76.6.956. PMID: 15948691.

Lin Y, Liu A, Xu Y, Tie L, Yu H, Li X. Effect of chronic unpredictable mild stress on brain–pancreas relative protein in rat brain and pancreas. *Behav Brain Res.* 2005;165(1):63–71. doi: 10.1016/j.bbr.2005.06.034.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.

Lowrance SA, Ionadi A, McKay E, Douglas X, Johnson JD. Sympathetic nervous system contributes to enhanced corticosterone levels following chronic stress. *Psychoneuroendocrinology*. 2016;68:163–70. doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.02.027. PMID: 26974501.

Lu H, Xu M, Wang F, Liu S, Gu J, Lin S, et al. Chronic stress accelerates ligature-induced periodontitis by suppressing glucocorticoid receptor- α signaling. *Exp Mol Med*. 2016;48(3):e223. doi: 10.1038/emmm.2015.127. PMID: 27012709.

Lu H, Xu M, Wang F, Liu S, Gu J, Lin S. Chronic stress enhances progression of periodontitis via $\alpha 1$ -adrenergic signaling: a potential target for periodontal disease therapy. *Exp Mol Med*. 2014;46(10):e118. doi: 10.1038/emmm.2014.65. PMID: 25323788.

Lu Y, Ho CS, Liu X, Chua AN, Wang W, McIntyre RS, et al. Chronic administration of fluoxetine and pro-inflammatory cytokine change in a rat model of depression. *PLoS One*. 2017;12(10). doi: 10.1371/journal.pone.0186700. PMID: 29049348.

Luo DD, An SC, Zhang X. Involvement of hippocampal serotonin and neuropeptide Y in depression induced by chronic unpredicted mild stress. *Brain Res Bull*. 2008;77(1):8–12. doi: 10.1016/j.brainresbull.2008.05.010.

Maes M. The immunoregulatory effects of antidepressants. *Hum Psychopharmacol Clin Exp*. 2001;16(1):95–103. doi: 10.1002/hup.191.

Magariños A, McEwen B, Flügge G, Fuchs E. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J Neurosci*. 1996;16(10):3534–40. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-10-03534.1996. PMID: 8627386.

Mann JJ. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology*. 1999;21(2 Suppl):99S–105S. doi: 10.1016/S0893-133X(99)00040-8. PMID: 10432495.

Marrin K, Drust B, Gregson W, Morris CJ, Chester N, Atkinson G. Diurnal variation in the salivary melatonin responses to exercise: relation to exercise-mediated tachycardia. *Eur J Appl Physiol*. 2011;111(11):2707–14. doi: 10.1007/s00421-011-1890-7.

Martins L, Spreafico C, Tanobe P, Tavares T, Castro M, Franco G, et al. Influence of adrenergic neuromodulation during induction of periodontitis in rats. *J Int Acad Periodontol*. 2017;19(3):80–8.

Márton IJ, Kiss C, Márton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2000;15(3):139–50. doi: 10.1034/j.1399-302X.2000.150301.x. PMID: 11154396.

Matos FS, Prado RF, Khoury RD, Oliveira LD, Valera MC, Tomson PL, et al. Anti-inflammatory and anti-resorptive efficacy of adrenergic blockers on late replanted rat incisors. *Dent Traumatol*. 2020;36(3):253–63. doi: 10.1111/edt.12523. PMID: 31647601.

Matsui H, Yamasaki M, Nakata K, Amano K, Nakamura H. Expression of MMP-8 and MMP-13 in the development of periradicular lesions. *Int Endod J*. 2011;44(8):739–45. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01880.x.

Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology*. 1992;76(1):42–7. PMID: 1628899.

Matsuzaki G, Umemura M. Interleukin-17 family cytokines in protective immunity against infections: role of hematopoietic cell-derived and non-hematopoietic cell-derived interleukin-17s. *Microbiol Immunol*. 2018;62(1):1–13. doi: 10.1111/1348-0421.12560.

McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol*. 2002;73(11):1377–91. doi: 10.1902/jop.2002.73.11.1377. PMID: 12479643.

McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Dialogues Clin Neurosci*. 2006;8(4):367–81. PMID: 17290796.

Mendes DC, de Oliveira Poswar F, de Oliveira MVM, Haikal DS, da Silveira MF, de Barros Lima Martins AME, et al. Analysis of socio-demographic and systemic health factors and the normative conditions of oral health care in a population of the Brazilian elderly. *Gerodontology*. 2012;29(2):e206–14. doi: 10.1111/j.1741-2358.2010.00446.x.

Menezes R, Bramante CM, da Silva Paiva KB, Letra A, Carneiro E, Fernando Zambuzzi W, et al. Receptor activator NFkappaB-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(3):404–9. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.10.054. PMID: 16920551.

Menezes R, Garlet TP, Letra A, Bramante CM, Campanelli AP, Figueira R de C, et al. Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. *J Endod*. 2008a;34(8):932–8. doi: 10.1016/j.joen.2008.05.002. PMID: 18634923.

Menezes R, Garlet TP, Trombone APF, Repeke CE, Letra A, Granjeiro JM, et al. The potential role of suppressors of cytokine signaling in the attenuation of inflammatory reaction and alveolar bone loss associated with apical periodontitis. *J Endod*. 2008b;34(12):1480–4. doi: 10.1016/j.joen.2008.09.003.

Michetti J, Maret D, Mallet J-P, Diemer F. Validation of cone beam computed tomography as a tool to explore root canal anatomy. *J Endod*. 2010;36(7):1187–90. doi: 10.1016/j.joen.2010.03.029.

Minhoto G, Khoury R, Orozco E, Prado R, Valera M. Effect of chronic unpredictable stress on the progression of experimental apical periodontitis in rats. *Int Endod J*. 2021;54(8):1342–52. doi: 10.1111/IEJ.13515. PMID: 33724486.

Minkowitz B, Boskey AL, Lane JM, Pearlman HS, Vigorita VJ. Effects of propranolol on bone metabolism in the rat. *J Orthop Res*. 1991;9(6):869–75. doi: 10.1002/jor.1100090613. PMID: 1919850.

Misra M, le Clair M, Mendes N, Miller KK, Lawson E, Meenaghan E, et al. Use of SSRIs may impact bone density in adolescent and young women with anorexia nervosa. *CNS Spectr*. 2010;15(9):579–86. doi: 10.1017/S1092852900000559.

Mojtabai R, Olfson M. Proportion of antidepressants prescribed without a psychiatric diagnosis is growing. *Health Aff*. 2011;30(8):1434–42. doi: 10.1377/hlthaff.2010.1024. PMID: 21821561.

Monteiro da Silva AM, Oakley DA, Newman HN, Nohl FS, Lloyd HM. Psychosocial factors and adult onset rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1996;23(8):789–94. doi: 10.1111/j.1600-051X.1996.tb00611.x.

Moore RE, Smith CK, Bailey CS, Voelkel EF, Tashjian AH. Characterization of beta-adrenergic receptors on rat and human osteoblast-like cells and demonstration that beta-receptor agonists can stimulate bone resorption in organ culture. *Bone Miner*. 1993;23(3):301–15. PMID: 7908582.

Mousavijazi Mahvash, Naderan A, Ebrahimpour M, Sadeghipour M. Association between psychological stress and stimulation of inflammatory responses in periodontal disease - PubMed. *J Dent (Tehran)*. 2013;10(1):103–11.

Muscat R, Willner P. Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: a methodological analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 1992;16(4):507–17. doi: 10.1186/s40360-019-0336-4.

Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;15(6):348–81. doi: 10.1177/154411130401500604. PMID: 15574679.

Nakajima K, Hamada N, Takahashi Y, Sasaguri K, Tsukinoki K, Umemoto T, et al. Restraint stress enhances alveolar bone loss in an experimental rat model. *J Periodontal Res*. 2006;41(6):527–34. doi: 10.1111/j.1600-0765.2006.00901.x. PMID: 17076777.

Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of nf-kb ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;275(3):768–75. doi: 10.1006/bbrc.2000.3379. PMID: 10973797.

Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*. 2010;13(10):1161–9. doi: 10.1038/nn.2647.

Nicot N, Hausman J-F, Hoffmann L, Evers D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot*. 2005;56(421):2907–14. doi: 10.1093/jxb/eri285.

Ohgi Y, Futamura T, Kikuchi T, Hashimoto K. Effects of antidepressants on alternations in serum cytokines and depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013;103(4):853–9. doi: 10.1016/j.pbb.2012.12.003.

Okada Y, Hamada N, Kim Y, Takahashi Y, Sasaguri K, Ozono S, et al. Blockade of sympathetic β -receptors inhibits *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in an experimental rat periodontitis model. *Arch Oral Biol.* 2010;55(7):502–8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.04.002. PMID: 20593554.

Ortuño MJ, Robinson ST, Subramanyam P, Paone R, Huang Y-Y, Guo XE, et al. Serotonin-reuptake inhibitors act centrally to cause bone loss in mice by counteracting a local anti-resorptive effect. *Nat Med.* 2016;22(10):1170–9. doi: 10.1038/nm.4166. PMID: 27595322.

Ottenweller JE, Natelson BH, Pitman DL, Drastal SD. Adrenocortical and behavioral responses to repeated stressors: toward an animal model of chronic stress and stress-related mental illness. *Biol Psychiatry.* 1989;26(8):829–41. doi: 10.1016/0006-3223(89)90123-6. PMID: 2590694.

Oury F, Yadav VK, Wang Y, Zhou B, Liu XS, Guo XE, et al. CREB mediates brain serotonin regulation of bone mass through its expression in ventromedial hypothalamic neurons. *Genes Dev.* 2010;24(20):2330–42. doi: 10.1101/gad.1977210. PMID: 20952540.

Padro C, Sanders V. Neuroendocrine regulation of inflammation. *Semin Immunol.* 2014;26(5):357–68. doi: 10.1016/J.SMIM.2014.01.003. PMID: 24486056.

Pariante C, Lightman S. The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci.* 2008;31(9):464–8. doi: 10.1016/J.TINS.2008.06.006. PMID: 18675469.

de Paula-Silva FWG, Santamaria M, Leonardo MR, Consolaro A, da Silva LAB. Cone-beam computerized tomographic, radiographic, and histologic evaluation of periapical repair in dogs' post-endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(5):796–805. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.06.016. PMID: 19734073.

Perić I, Stanisavljević A, Gass P, Filipović D. Fluoxetine reverses behavior changes in socially isolated rats: role of the hippocampal GSH-dependent defense system and proinflammatory cytokines. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2017;267(8):737–49. doi: 10.1007/s00406-017-0807-9. PMID: 28474231.

Peruzzo DC, Benatti BB, Ambrosano GMBB, Nogueira-Filho GR, Sallum EA, Casati MZ, et al. A systematic review of stress and psychological factors as possible risk factors for periodontal disease. *J Periodontol.* 2007;78(8):1491–504. doi: 10.1902/jop.2007.060371. PMID: 17668968.

Pinto KP, Ferreira CM, Maia LC, Sassone LM, Fidalgo TKS, Silva EJNL. Does tobacco smoking predispose to apical periodontitis and endodontic treatment need? A systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2020a;53(8):1068–83. doi:

10.1111/iej.13316. PMID: 32344459.

Pinto KP, Ferreira CMA, Guimarães AFC, Lima CO, Pires FR, Sassone LM, et al. Effects of alcohol and nicotine consumption on the development of apical periodontitis in rats: a correlative micro-computed tomographic, histological and immunohistochemical study. *Int Endod J*. 2020b;53(9):1238–52. doi: 10.1111/iej.13344. PMID: 32516436.

Prieto AKC, Gomes-Filho JE, Azuma MM, Sivieri-Araújo G, Narciso LG, Souza JC, et al. Influence of apical periodontitis on stress oxidative parameters in diabetic rats. *J Endod*. 2017;43(10):1651–6. doi: 10.1016/j.joen.2017.05.014. PMID: 28756960.

Rebouças E de L, Costa JJ do N, Passos MJ, Passos JR de S, Hurk R van den, Silva JRV. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. *Braz Arch Biol Technol*. 2013;56(1):143–54. doi: 10.1590/S1516-89132013000100019.

Reddy MS, Geurs NC, Gunsolley JC. Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003;8(1):12–37. doi: 10.1902/annals.2003.8.1.12. PMID: 14971246.

Remus JL, Stewart LT, Camp RM, Novak CM, Johnson JD. Interaction of metabolic stress with chronic mild stress in altering brain cytokines and sucrose preference. *Behav Neurosci*. 2015;129(3):321–30. doi: 10.1037/BNE0000056. PMID: 25914924.

Rizzoli R, Cooper C, Reginster J, Abrahamsen B, Adachi JD, Brandi ML, et al. Antidepressant medications and osteoporosis. *Bone*. 2012;51(3):606–13. doi: 10.1016/j.bone.2012.05.018. PMID: 22659406.

Rôças IN, Siqueira JF, Del Aguila CA, Provenzano JC, Guilherme BPS, Gonçalves LS. Polymorphism of the CD14 and TLR4 genes and post-treatment apical periodontitis. *J Endod*. 2014;40(2):168–72. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.006. PMID: 24461398.

Rodrigues W, Miguel C, Lazo-Chica J, Trindade Da Silva C, Vieira C, Clemente-Napimoga J, et al. Interleukin-6, tumor necrosis factor- α , C-reactive protein, and hematological parameters in experimental periodontal disease after β -adrenergic blockade. *J Indian Soc Periodontol*. 2019;23(6):511–6. doi: 10.4103/jisp.jisp_77_19.

Rodrigues WF, Madeira MFM, da Silva TA, Clemente-Napimoga JT, Miguel CB, Dias-da-Silva VJ, et al. Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. *Br J Pharmacol*. 2012;165(7):2140–51. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01686.x. PMID: 21950592.

Rohini G, Kalaivani S, Kumar V, Rajasekar SA, Tuckaram J, Pandey V. Estimation and comparison of serum cortisol levels in periodontally diseased patients and periodontally healthy individuals: A clinical-biochemical study. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015;7(6):S457–60. doi: 10.4103/0975-7406.163501.

Rosania AE, Low KG, McCormick CM, Rosania DA. Stress, depression, cortisol, and

periodontal disease. *J Periodontol*. 2009;80(2):260–6. doi: 10.1902/jop.2009.080334. PMID: 19186966.

Roumestan C, Michel A, Bichon F, Portet K, Detoc M, Henriquet C, et al. Anti-inflammatory properties of desipramine and fluoxetine. *Respir Res*. 2007;8(1):35. doi: 10.1186/1465-9921-8-35. PMID: 17477857.

Sacre S, Medghalchi M, Gregory B, Brennan F, Williams R. Fluoxetine and citalopram exhibit potent antiinflammatory activity in human and murine models of rheumatoid arthritis and inhibit toll-like receptors. *Arthritis Rheum*. 2010;62(3):683–93. doi: 10.1002/art.27304. PMID: 20131240.

Salinas-Muñoz M, Garrido-Flores M, Baeza M, Huamán-Chipana P, García-Sesnich J, Bologna R, et al. Bone resorptive activity in symptomatic and asymptomatic apical lesions of endodontic origin. *Clin Oral Investig*. 2017;21(8):2613–8. doi: 10.1007/s00784-017-2062-x. PMID: 28261746.

Samuel RO, Ervolino E, Queiroz ÍO de A, Azuma MM, Ferreira GT, Cintra LTA. Th1/Th2/Th17/Treg balance in apical periodontitis of normoglycemic and diabetic rats. *J Endod*. 2019;45(8):1009–15. doi: 10.1016/J.JOEN.2019.05.003. PMID: 31227229.

Sapolsky R, Krey L, McEwen B. Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(19):6174–7. doi: 10.1073/PNAS.81.19.6174. PMID: 6592609.

Segura-Egea JJ, Martín-González J, Castellanos-Cosano L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. *Int Endod J*. 2015;48(10):933–51. doi: 10.1111/iej.12507.

Seifert CF, Wiltrout TR. Calcaneal bone mineral density in young adults prescribed selective serotonin reuptake inhibitors. *Clin Ther*. 2013;35(9):1412–7. doi: 10.1016/j.clinthera.2013.07.423. PMID: 23958172.

Selye H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1946;6:117–230. doi: 10.1210/jcem-6-2-117. PMID: 21025115.

Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*. 1936;138(3479):32. doi: 10.1038/138032a0.

Shadmehr E, Khademi A. Effect of simvastatin on kinetics of osteoprotegrin/receptor activator nuclear kappa B ligand mRNA expression in periapical lesions. *Int Endod J*. 2013;46(11):1077–82. doi: 10.1111/iej.12101.

Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*. 2007;86(4):306–19. doi: 10.1177/154405910708600403.

Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev*.

2003;55(2):325–95. doi: 10.1124/pr.55.2.2.

Sousa NGK, Cardoso CR de B, Silva JS da, Kuga MC, Tanomaru-Filho M, Faria G. Association of matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) with the expression of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 during periapical lesion development. *Arch Oral Biol*. 2014;59(9):944–53. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.05.021. PMID: 24927330.

Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(4):498–521. doi: 10.1177/10454411980090040701.

Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*. 2000;29(2):332–7. doi: 10.2144/00292rv02.

Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*. 2002;111(3):305–17. PMID: 12419242.

Tani-Ishii N, Wang C, Tanner A, Stashenko P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol*. 1994;9(3):129–35. doi: 10.1111/J.1399-302X.1994.TB00048.X. PMID: 7936717.

Tibúrcio-Machado CS, Michelon C, Zanatta FB, Gomes MS, Marin JA, Bier CA. The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J*. 2020;iej.13467. doi: 10.1111/iej.13467.

Ulrich-Lai Y, Figueiredo H, Ostrander M, Choi D, Engeland W, Herman J. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(5). doi: 10.1152/AJPENDO.00070.2006. PMID: 16772325.

Vitale G, Ruggieri V, Filaferro M, Frigeri C, Alboni S, Tascetta F, et al. Chronic treatment with the selective NOP receptor antagonist [Nphe1,Arg14,Lys15]N/OFQ-NH2 (UFP-101) reverses the behavioural and biochemical effects of unpredictable chronic mild stress in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009;207(2):173–89. doi: 10.1007/s00213-009-1646-9.

Voznesenskaia TG, Safonova VA, Platonova NM. [Disorder of eating behavior and comorbid syndromes in obesity and methods of their correction]. *Zhurnal Nevrol i Psikiatrii Im SS Korsakova*. 2000;100(12):49–52. PMID: 11195539.

Wan C, Yuan G, Yang J, Sun Q, Zhang Li, Zhang J, et al. MMP9 deficiency increased the size of experimentally induced apical periodontitis. *J Endod*. 2014;40(5):658–64. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.003.

Wang CY, Tani-Ishii N, Stashenko P. Bone-resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat. *Oral Microbiol Immunol*. 1997;12(2):65–71. doi: 10.1111/j.1399-302X.1997.tb00619.x. PMID: 9227128.

Warden SJ, Nelson IR, Fuchs RK, Blizotes MM, Turner CH. Serotonin (5-

hydroxytryptamine) transporter inhibition causes bone loss in adult mice independently of estrogen deficiency. *Menopause*. 2008;15(6):1176–83. doi: 10.1097/gme.0b013e318173566b. PMID: 18725867.

Warden SJ, Robling AG, Sanders MS, Bliziotes MM, Turner CH, Rohling AG, et al. Inhibition of the serotonin (5-hydroxytryptamine) transporter reduces bone accrual during growth. *Endocrinology*. 2005;146(2):685–93. doi: 10.1210/en.2004-1259. PMID: 15539550.

Webster Marketon JI, Glaser R. Stress hormones and immune function. *Cell Immunol*. 2008;252(1–2):16–26. doi: 10.1016/j.cellimm.2007.09.006. PMID: 18279846.

Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress*. 2016;6:78–93. doi: 10.1016/J.YNSTR.2016.08.002. PMID: 28229111.

Willner P, Moreau JL, Nielsen CK, Papp M, Sluzewska A. Decreased hedonic responsiveness following chronic mild stress is not secondary to loss of body weight. *Physiol Behav*. 1996;60(1):129–34. doi: 10.1016/0031-9384(95)02256-2. PMID: 8804652.

Willner P, Muscat R, Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 1992;16(4):525–34. PMID: 1480349.

Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987;93(3):358–64. doi: 10.1007/BF00187257. PMID: 3124165.

Wong DT, Bymaster FP, Engleman EA. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci*. 1995;57(5):411–41. PMID: 7623609.

Wong DT, Bymaster FP, Reid LR, Fuller RW, Perry KW. Inhibition of serotonin uptake by optical isomers of fluoxetine. *Drug Dev Res*. 1985;6(4):397–403. doi: 10.1002/ddr.430060412.

Wong DT, Perry KW, Bymaster FP. Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(9):764–74.

Wu Q, Magnus JH, Liu J, Bencaz AF, Hentz JG. Depression and low bone mineral density: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Osteoporos Int*. 2009;20(8):1309–20. doi: 10.1007/s00198-009-0918-x. PMID: 19343469.

Wu Y, Zhu L, Wei H, Peng B. Regulation of matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and extracellular metalloproteinase inducer by interleukin-17 in human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod*. 2013;39(1):62–7. doi: 10.1016/j.joen.2012.09.025.

Xiong H, Wei L, Peng B. The presence and involvement of interleukin-17 in apical periodontitis. *Int Endod J*. 2019;iej.13112. doi: 10.1111/iej.13112.

Xu R, Guo D, Zhou X, Sun J, Zhou Y, Fan Y, et al. Disturbed bone remodelling activity varies in different stages of experimental, gradually progressive apical periodontitis in rats. *Int J Oral Sci*. 2019;11(3). doi: 10.1038/S41368-019-0058-X. PMID: 31451690.

Yadav VK, Oury F, Suda N, Liu Z-W, Gao X-B, Confavreux C, et al. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell*. 2009;138(5). doi: 10.1016/j.cell.2009.06.051. PMID: 19737523.

Yang S, Zhu L, Xiao L, Shen Y, Wang L, Peng B, et al. Imbalance of interleukin-17+ T-cell and Foxp3+ regulatory T-cell dynamics in rat periapical lesions. *J Endod*. 2014;40(1):56–62. doi: 10.1016/j.joen.2013.09.033. PMID: 24331992.

Yaron I, Shirazi I, Judovich R, Levartovsky D, Caspi D, Yaron M. Fluoxetine and amitriptyline inhibit nitric oxide, prostaglandin E2, and hyaluronic acid production in human synovial cells and synovial tissue cultures. *Arthritis Rheum*. 1999;42(12):2561–8. doi: 10.1002/1529-0131(199912)42:12<2561::AID-ANR8>3.0.CO;2-U. PMID: 10616001.

Yoneda N, Noiri Y, Matsui S, Kuremoto K, Maezono H, Ishimoto T, et al. Development of a root canal treatment model in the rat. *Sci Rep*. 2017;7(1). doi: 10.1038/S41598-017-03628-6. PMID: 28607360.

Zhang W, Guo Y, Han W, Yang M, Wen L, Wang K, et al. Curcumin relieves depressive-like behaviors via inhibition of the NLRP3 inflammasome and kynurenine pathway in rats suffering from chronic unpredictable mild stress. *Int Immunopharmacol*. 2019;67:138–44. doi: 10.1016/J.INTIMP.2018.12.012. PMID: 30551030.

Zhang W, Liu S, Li H, Cai H. Chronic unpredictable mild stress affects myocardial metabolic profiling of SD rats. *J Pharm Biomed Anal*. 2012;70:534–8. doi: 10.1016/J.JPBA.2012.04.032. PMID: 22658902.

Zhao YW, Pan YQ, Tang MM, Lin WJ. Blocking p38 signaling reduces the activation of pro-inflammatory cytokines and the phosphorylation of p38 in the habenula and reverses depressive-like behaviors induced by neuroinflammation. *Front Pharmacol*. 2018;9(MAY). doi: 10.3389/fphar.2018.00511.

Zheng H, Liu Y, Li W, Yang B, Chen D, Wang X, et al. Beneficial effects of exercise and its molecular mechanisms on depression in rats. *Behav Brain Res*. 2006;168(1):47–55. doi: 10.1016/J.BBR.2005.10.007. PMID: 16290283.

Zivanovic S, Papic M, Vucicevic T, Miletic Kovacevic M, Jovicic N, Nikolic N, et al. Periapical lesions in two inbred strains of rats differing in immunological reactivity. *Int Endod J*. 2021. doi: 10.1111/iej.13638.

ANEXO A —Certificado do comitê de ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos



Instituto de Ciência e Tecnologia
São José dos Campos
UNESP



CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 10/2018, intitulado:- **"Avaliação da progressão da lesão periapical em animais submetidos a condições de estresse e modulação inflamatória através de bloqueador adrenérgico e inibidor seletivo da receptação da serotonina "** sob a responsabilidade de **MARCIA CARNEIRO VALERA**, tendo com colaboradoras :- **Doutorando RAYANA DUARTE KHOURY** e a Profa. Dra. **RENATA FALCHETE DO PRADO**, e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP), em reunião de 29/06/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	29/06/2018 a 30/11/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogêneo Wistar
Nº de Animais	40
Peso/Idade	200 grs / 45 dias
Sexo	macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 29 de junho de 2018

Profa.Dra. **PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO**
Coordenadora

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9076
Fax (12) 3947-9010 / guedes@fosjc.unesp.br/komori@fosjc.unesp.br