

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/02/2023.



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP)  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia  
Área de Concentração: Estomatologia



**MARIA CLARA BERTOLINI BOTELHO**

**Impacto do estresse precoce de vida sobre a progressão  
da periodontite apical e da doença periodontal: estudo  
comportamental e histológico em ratos**

**Araçatuba - SP  
2021**

**MARIA CLARA BERTOLINI BOTELHO**

**Impacto do estresse precoce de vida sobre a progressão  
da periodontite apical e da doença periodontal: estudo  
comportamental e histológico em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do título de ‘Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Galera Bernabé

Coorientadores: Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra

Profa. Dra. Sandra Helena Penha Oliveira

**Araçatuba - SP  
2021**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B748i Botelho, Maria Clara Bertolini.  
Impacto do estresse precoce de vida sobre a progressão da periodontite apical e da doença periodontal: estudo comportamental e histológico em ratos / Maria Clara Bertolini Botelho. – Araçatuba, 2021.  
59 f. : il. ; tab.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientador: Prof. Daniel Galera Bernabé  
Coorientador: Prof. Luciano Tavares Ângelo Cintra  
Coorientadora: Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira

1. Estresse psicológico 2. Ansiedade 3. Periodontite periapical 4. Doenças periodontais 5. Inflamação I. T.

Black D6  
CDD 617.63

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

*Dedico esta dissertação de mestrado à minha família, que nunca mediu esforços para que eu realizasse este e tantos outros sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus e Nossa Senhora de Aparecida**, por tornarem tudo isso possível. Agradeço pela minha vida, minha saúde e por todas as oportunidades que são a mim apresentadas.

Aos meus pais, **Ricardo e Vanessa**, verdadeiros exemplos de amor incondicional, carinho e cuidado. Agradeço por estarem sempre comigo e por me ensinarem valores que fazem de mim a pessoa que sou hoje. Obrigada por todo investimento a mim destinado, por toda confiança, apoio e por me estimularem a ser um ser humano melhor a cada dia. Vocês são meu maior espelho e minha maior força, eu amo vocês incondicionalmente e esta conquista é nossa!

Aos meus irmãos, **Maria Tereza e Ricardo**, meus companheiros de jornada e meus melhores amigos, eu amo vocês! Agradeço por me apoiarem, por me aconselharem e por toda a felicidade que transcende o nosso relacionamento. Sou conhecida como uma irmã superprotetora e preocupada, algo que eu sempre reconheci em mim, mas hoje eu entendo que esta característica reflete a importância de vocês em minha vida. A felicidade de vocês dois também é a minha!

Ao meu namorado e amigo, **José**, companheiro para todas as horas. Agradeço por me estimular na corrida pelos meus sonhos e ideais. Um parceiro de laboratório insubstituível e um namorado incrível, que me apoia e compreende todas as demandas derivadas desta intensa caminhada acadêmica. Obrigada por todos os abraços, pelas palavras de incentivo e por me transmitir a paz que muitas vezes eu não encontro dentro de mim mesma. Eu amo você e esta conquista é sua também.

Às minhas famílias, **Bertolini e Botelho**, dois sobrenomes que tenho muito orgulho de carregar comigo. Famílias com tradições e características tão diferentes,

mas muito semelhantes no amor e na alegria que envolve todos os nossos encontros. Agradeço em especial às minhas avós, **Denires e Maria Tereza**, por estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida. Obrigada pelas orações, pelas palavras de força, amor e cuidado que sempre ofereceram a mim.

Aos meus **amigos** de Ourinhos, Campinas e de faculdade. À minha amiga de infância, **Yara Maria**, por estar sempre comigo mesmo a quilômetros de distância. Você é muito mais que uma amiga, é uma irmã que eu considero e amo muito. Agradeço também ao meu amigo **João Vitor Virgílio**, por compartilhar comigo muitos momentos e principalmente o amor pela Biologia. À minha amiga **Fernanda Almeida**, ex-parceira de apartamento e uma amiga-irmã que foi embora, mas não permitiu que o nosso contato se perdesse. Esta conquista também é sua, que viveu muitos destes momentos comigo. Aos meus amigos **Paulo Augusto, Mayara e Jaqueline** por serem ótimos companheiros na distância, darem os melhores conselhos e por me fazerem rir nas horas em que a ansiedade toma conta.

Aos meus colegas de pós-graduação, **Gabriela, Ana Daniela, Daniela Cantieri, Giseli, Jéssica, Tamara, Saygo, Bruna, Daniela Bastos, Vitor, Felipe e Winicius**. Obrigada por tornarem a pós-graduação mais leve, por todas as risadas, conselhos e momentos que compartilhamos juntos. Em especial, agradeço à **Gabriela Lopes dos Santos**, minha colega de apartamento e um ser humano ímpar que é capaz de transformar uma situação triste em uma piada em menos de 1 minuto. Agradeço por nossos caminhos terem se cruzado e por compartilhar com você uma amizade que quero levar para a vida toda. Tenho um orgulho imenso de você e de tudo que você ainda vai conquistar! Também faço um agradecimento especial à **Jéssica**, pela amizade que vem desde a orientação na minha iniciação científica e por ter me ensinado o protocolo de indução do estresse precoce utilizado neste trabalho.

À **Giseli**, uma pessoa muito especial e que sempre me ajudou nos experimentos e nas atividades da pós-graduação. Gi, você se tornou uma grande amiga e é uma honra aprender com você!

Aos alunos de iniciação científica, **Rosani, Mylena e Marcos**, essenciais para a execução dos experimentos e cuidado com os animais deste estudo. Agradeço pelo auxílio e pela confiança. A finalização deste trabalho também é fruto da dedicação de vocês, obrigada!

Aos alunos do **Laboratório de Endodontia**, em especial à doutoranda **Cristiane Cantiga**. Obrigada Cris, por toda receptividade, paciência e ajuda em todas as etapas experimentais. Você se tornou um dos meus maiores exemplos dentre os alunos de pós-graduação, por toda a habilidade técnica e amor por ensinar (quantas vezes forem necessárias). Tenho certeza que um futuro brilhante te aguarda e este trabalho não seria possível sem você.

Ao meu professor e orientador, **Prof. Dr. Daniel Galera Bernabé**, agradeço por toda confiança e oportunidades que oferece a mim. Uma caminhada que começou na Disciplina de Estomatologia I e II, que se estendeu para um treinamento técnico na disciplina e então, para uma Iniciação Científica. E hoje, finalizando uma etapa tão importante da minha vida e após pouco mais de 5 anos de convivência, posso dizer que nos tornamos grandes amigos. Professor, muito obrigada pelos incentivos acadêmicos e pessoais diários. O senhor é uma fonte de inspiração para os que desejam ensinar e também produzir Ciência de qualidade. Sua paixão pelo que faz e principalmente por tudo que envolve a mente humana, é um dos principais motivos de eu ter abraçado seu ideal e de mais uma vez estar finalizando um trabalho dentro desta linha de pesquisa.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra**, por todo o auxílio, fundamental para a realização deste estudo. Agradeço por toda confiança, paciência e tempo disponibilizado para responder às minhas dúvidas, me ensinar as diferentes fases metodológicas e até mesmo explicar os mecanismos biológicos envolvidos em meus resultados. O senhor se tornou uma fonte de inspiração científica para mim e foi uma honra poder trabalhar junto de seu laboratório e equipe de pesquisa.

À minha coorientadora, **Profa. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira**, uma grande parceira do nosso grupo de pesquisa. Agradeço por abrir as portas de seu laboratório para realização dos meus experimentos e por estar sempre disponível quando precisei. A senhora é com certeza uma grande inspiração para nós mulheres que estamos envolvidas no meio científico.

Ao professor, **Roelf Justino Cruz Rizzolo**, meu primeiro orientador e um amigo que se mantém presente mesmo distante. Agradeço pelos incentivos iniciais e por ter me ensinado tanto sobre Ciência e sobre o cérebro humano, duas paixões que com certeza influenciaram muito minhas decisões até hoje.

Aos professores da disciplina de Estomatologia, ao **Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara**, também diretor da nossa faculdade, pelo incentivo e ensinamentos transmitidos a mim desde a minha graduação. Ao **Prof. Dr. Éder Ricardo Biasoli**, por me proporcionar crescimento pessoal e profissional. À **Profa. Dra. Kellen Cristine Tijoe**, por me proporcionar um aprendizado ímpar através de seus conselhos e aulas descontraídas que revelavam muito do seu enorme potencial como pesquisadora e profissional, uma inspiração para todos os alunos.

Ao **Departamento de Diagnóstico e Cirurgia**, representado neste trabalho pelo **Laboratório de Patologia**. Agradeço aos professores **Profa. Dra. Cristiane Furuse, Prof. Dr. Marcelo Macedo Crivelini, Profa. Dra. Renata Callestini, Profa. Dra. Ana Cláudia Okamoto e Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Filho**, pelo suporte oferecido na realização de etapas experimentais importantes deste trabalho.

Ao **Centro de Oncologia Bucal (COB)**, pela imensa oportunidade de crescer profissionalmente e como ser humano. Agradeço toda a equipe multiprofissional, **Gabrielle Duarte, Aline, Regiane Nogueira, Anne Cocato, Daniene Ribeiro, Francisco Collado**, que nos proporciona uma convivência muito rica em aprendizado. Agradeço também à ex-funcionária Jane, uma pessoa especial e que sempre nos recebeu com muito carinho. Um agradecimento especial para a funcionária **Adriana de Paula**, que me acompanha desde a minha Iniciação Científica e no início do mestrado através da convivência diária no Laboratório de Patologia, me dando muitos conselhos e cuidando sempre de mim. Obrigada **Dri**, você é uma pessoa que tem um lugar muito especial no meu coração.

À **Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba**, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, representada pelo **diretor Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara e vice-diretor Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem**. Agradeço imensamente por todo o suporte e oportunidades oferecidos. A FOA com certeza é um lugar com um significado muito especial para mim, o lugar que me proporcionou a realização de dois grandes sonhos, onde vivi momentos muito importantes e onde encontrei pessoas incríveis. Só tenho a agradecer.

Agradeço a todos os **funcionários**, que são indispensáveis para o funcionamento da Universidade, em especial às funcionárias da **Seção de Pós-Graduação** e os funcionários da **Biblioteca**. Agradeço pelas orientações,

disponibilidade e dedicação na realização de suas respectivas funções e até mesmo do que vai além disso.

Aos **animais** que foram utilizados neste estudo, responsáveis pela geração de evidências científicas que são muito importantes para a sociedade. Meu respeito e agradecimento.

As pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste estudo e para que este momento fosse possível, meus eternos agradecimentos.

*“A realidade não consiste apenas nas coisas que já conhecemos. Ela inclui o que existe, mas ainda ignoramos — e que só viremos a conhecer no futuro, talvez quando tivermos construído instrumentos melhores para auxiliar nossos cinco sentidos. Sempre existiram átomos, mas só recentemente tivemos certeza disso, e é provável que nossos descendentes saibam muitas outras coisas que hoje desconhecemos. É o fascínio e o prazer da Ciência: ela revela coisas continuamente.”*

*Richard Dawkins*

# LISTA DE FIGURAS

## Capítulo 1

- Figure 1 - Figure 1. Photomicrographs of periapical region after 40 days of pulp exposure.** H&E staining in control rats (**A, a1, a2**) showed periapical region free of inflammatory infiltrate; ELS rats (**B, b1, b2**) showed similar aspects of control rats with periapical region free of inflammatory infiltrate; Rats with AP (**C, c1, c2**) showed a moderate inflammatory infiltrate around the apex, disruption of periodontal ligament and bone resorption area; Rats with AP previously subjected to ELS (**D, d1, d2**) had intense inflammatory infiltrate, as well as extensive periapical bone resorption area. (A-D, 50x; a1-d1 and a2-d2, 400x increase). 26
- Figure 2 - Figure 2. Comparison of anxiety-like behavior measured by EZM among experimental groups.** **A.** There were no significant differences between the control and ELS groups. AP rats attended for less time the open arms of the apparatus in relation to control rats, showing more anxiety in the rats subjected to AP induction. The same was observed in the AP rats when comparing to AP-stressed rats, where AP rats attended for less time the open arms when compared to the animals stressed with the disease. **B.** ELS rats had less entries in the open areas than control rats. ELS rats also had less entries in the open arms of the apparatus when compared with AP-stressed rats. When comparing the AP and AP-stressed groups, we notice that the AP rats tried less often to enter the open arms. Bar graphs represent mean  $\pm$  SEM. *Student t-test*. \* $p < 0.05$ . 28

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 2

- Figure 1 - Figure 1. Representative images of histological analysis of periodontal region.** H&E staining in control group (**A, a1**) showed periodontal region free of inflammatory infiltrate (x100 and x400, respectively); PD group showed a moderate bone resorption area with loss of conjunctive insertion (**B**) (x50), and moderate inflammatory infiltrate around the roots and in furca region (**b1-b5**) (x100 and x400, respectively); ELS group (**C, c1**) showed similar aspects of control group with periodontal region free of inflammatory infiltrate (x100 and x400, respectively); ELS+PD group showed a large bone resorption area with loss of conjunctive insertion (**D**) (x50), and moderate inflammatory infiltrate around the roots and in furca region (**d1-d5**) (x100 and x400, respectively). 46
- Figure 2 - Figure 2. Anxiety-like behavior in the rats with PD exposed or not to ELS.** **A.** There were significant differences between the PD and control groups. The same was observed when comparing PD-stressed and PD non-stressed rats. **B.** The ELS rats displayed a lower number of entries in relation to control rats. Likewise can be observed for the stressed group subjected to PD induction compared to the PD group not exposed to ELS. Bar graphs represent mean  $\pm$  SEM. *Student t-test*. \*p < 0.05. 48

# LISTA DE TABELAS

## Capítulo 1

<b>Table 1 –</b>	Scores, median, mean, and standard deviation of the histological findings.	25
------------------	--	----

## Capítulo 2

<b>Table 1 -</b>	Scores, median, mean, and standard deviation of the histological findings.	45
------------------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABL	Alveolar bone loss
AP	Apical Periodontitis
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELS	Early life stress
EZM	Elevated Zero Maze Test
H&E	Hematoxylin and Eosin
HPA	Hypothalamic-pituitary-adrenal axis
MS	Maternal Separation
PBD	Post-birth
PD	Periodontal Disease
SNS	Sympathetic Nervous System
WHO	World Health Organization

BOTELHO MCB. Impacto do estresse precoce de vida sobre a progressão da periodontite apical e da doença periodontal: estudo comportamental e histológico em ratos [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista; 2021.

## **RESUMO GERAL**

Estímulos estressores durante a infância afetam negativamente as funções fisiológicas, alterando as respostas inflamatórias, imunes, neuro-hormonais e comportamentais. Há evidências de que o estresse precoce de vida (EPV) pode ser um fator de risco direto ou indireto para o desenvolvimento de algumas doenças metabólicas e inflamatórias na idade adulta. No entanto, apesar de existirem evidências de que o estresse influencia na progressão da periodontite apical (PA) e da doença periodontal (DP), o impacto do EPV sobre estas doenças é pouco estudado. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a influência do EPV sobre a PA e DP induzidas experimentalmente em ratos. No presente estudo foram utilizados sessenta ratos machos Wistar, divididos em 6 grupos experimentais (n=10): Grupo controle: ratos não submetidos ao EPV ou a indução das doenças; Grupo EPV: ratos submetidos ao EPV; Grupo PA: ratos com PA; Grupo EPV+PA: ratos submetidos à indução da PA e do EPV; Grupo DP: ratos com DP e Grupo EPV+DP: ratos submetidos à indução da DP e do EPV. O EPV foi induzido pelo método de separação materna (SM) por um período de 3 horas durante 21 dias consecutivos. Ao completarem 90 dias, os animais dos grupos PA e EPV+PA foram submetidos à indução da PA através da exposição pulpar do primeiro e segundo molares superiores do lado direito. A indução da DP foi realizada nos grupos DP e EPV+DP através da inserção e manutenção de uma ligadura no segundo molar superior esquerdo. O protocolo de exposição pulpar para a PA e manutenção da ligadura para os animais com DP, foi de cinco semanas. O teste labirinto elevado em zero (LEZ) foi realizado em todos os animais com 37 dias após a indução das doenças para avaliar o comportamento de ansiedade. Após 3 dias do teste LEZ, os animais foram eutanasiados e as maxilas foram coletadas. Posteriormente, foi realizada análise histológica e histométrica para avaliação do infiltrado inflamatório e extensão das lesões induzidas experimentalmente. A análise histológica revelou maior intensidade do infiltrado inflamatório para os animais com PA e DP expostos ao EPV ( $p < 0.05$ ). A

análise histométrica mostrou maior extensão das lesões periapicais nos animais com PA expostos ao EPV quando comparado aos animais com PA não estressados ( $p < 0.05$ ). Já para os animais com DP, não houve diferença na extensão da perda óssea alveolar entre os animais com DP submetidos ou não ao EPV ( $p > 0.05$ ). A análise comportamental revelou um aumento do comportamento ansioso no grupo PA em relação ao grupo controle ( $p < 0.05$ ). No entanto, a exposição ao EPV anulou este efeito da PA sobre o comportamento, já que os animais do grupo EPV+PA frequentaram por mais tempo os braços abertos do aparelho ( $p < 0.05$ ). Já para os ratos submetidos à indução de DP, foi observado aumento do tempo nos braços abertos dos grupo DP em relação ao grupo controle ( $p < 0.05$ ). O mesmo aconteceu com o grupo DP em relação ao grupo DP-estressado ( $p < 0.05$ ). Os resultados do presente estudo indicam que o EPV afeta a progressão da periodontite apical, exacerbando o processo inflamatório e a reabsorção óssea periapical. Contudo, apesar de agravar a intensidade da inflamação na doença periodontal, o EPV não afeta a reabsorção óssea alveolar.

**Palavras-chave:** Estresse psicológico. Periodontite apical. Doença periodontal.

BOTELHO MCB. Impact of early life stress on the progression of apical periodontitis and periodontal disease: behavioral and histological study in rats [dissertation]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista; 2021.

## **GENERAL ABSTRACT**

Stress stimuli during childhood negatively affect physiological functions, altering inflammatory, immune, neuroendocrine responses and behavior. There is evidence that early life stress (ELS) can be a direct or indirect risk factor for the development of some metabolic and inflammatory diseases in adulthood. However, although there is evidence that stress influences the progression of apical periodontitis (AP) and periodontal disease (PD), the impact of ELS on these diseases is little studied. Therefore, this study aimed to evaluate the influence of ELS on experimentally induced AP and PD in rats. Sixty Wistar male rats were used in this study, divided into 6 experimental groups (n=10): Control Group: rats not subjected to ELS or to induction of diseases; ELS Group: rats subjected to ELS; PA Group: rats with PA; ELS+AP Group: rats subjected to induction of AP and ELS; PD Group: rats with PD and ELS+PD Group: rats subjected to induction of PD and ELS. ELS was induced by the method of maternal separation (MS) for a period of 3 hours for 21 consecutive days. On completing 90 days, the animals of the AP and ELS+AP groups were subjected to induction of AP through pulpal exposure of the right upper and lower first and second molars. Induction of PD was performed in the PD and ELS+PD groups through the insertion and maintenance of a ligature in the upper second left molar. The pulp exposure protocol for AP and ligation maintenance for animals with PD was five weeks. The elevated zero maze test (EZM) was performed on all animals at 37 days after diseases induction to assess anxiety-like behavior. After 3 days of the EZM test, the rats were euthanized and the jaws were collected. Subsequently, histological and histometric analysis was performed to evaluate the inflammatory infiltrate and extent of the experimentally induced lesions. Histological analysis revealed greater intensity of inflammatory infiltrate for the animals with AP and PD exposed to ELS ( $p<0.05$ ). Histometric analysis showed greater extension of periapical lesions in animals with AP exposed to ELS when compared to non-stressed animals with AP ( $p<0.05$ ). As for the animals with PD, there was no difference in the extent of alveolar bone loss between

the animals with PD submitted or not to ELS ( $p>0.05$ ). Behavioral analysis revealed an increase in anxious behavior in the AP group compared to the control group ( $p<0.05$ ). However, exposure to ELS decreased this effect of AP on behavior, since the animals in the ELS+AP group frequented the open arms of the apparatus for longer. For the PD rats, an increase in time in the open arms was observed compared to the control rats ( $p<0.05$ ). The same was true for the PD rats compared to the PD-stressed rats ( $p<0.05$ ). The results of this study indicate that early life stress affects the progression of apical periodontitis, exacerbating the inflammatory process and periapical bone resorption. However, although it aggravates the intensity of inflammation in periodontal disease, early life stress does not affect alveolar bone resorption.

**Keywords:** Psychological stress. Apical periodontitis. Periodontal disease.

## SUMÁRIO

1 CAPÍTULO 1 - Early life stress predicts more aggressive experimental apical periodontitis in adult rats .....	19
1.1 Abstract.....	21
1.2 Introduction .....	22
1.3 Materials and Methods.....	23
1.3.1 Animals and maintenance conditions .....	23
1.3.2 Experimental design .....	23
1.3.3 Early life stress induction.....	24
1.3.4 Induction of apical periodontitis .....	24
1.3.5 Anxiety-like behavior test.....	24
1.3.6 Sample obtaining and processing .....	25
1.3.7 Histological and histometric analysis .....	25
1.3.8 Statistical analysis .....	26
1.4 Results .....	26
1.4.1 Histological and histometric analysis of Apical Periodontitis.....	26
1.4.2 Anxiety levels in rats subject to ELS and AP .....	29
1.5 Discussion.....	30
1.6 References.....	33
2 CAPÍTULO 2 - Early life stress aggravates the inflammation of periodontal disease induced in rats .....	38
2.1 Abstract.....	39
2.2 Introduction .....	41
2.3 Material and Methods .....	42
2.3.1 Animals and maintenance conditions .....	42
2.3.2 Experimental design .....	42
2.3.3 Early life stress model .....	43
2.3.4 Anxiety-like behavior test.....	43
2.3.5 Induction of periodontal disease .....	44
2.3.6 Sample obtaining and processing .....	44
2.3.7 Histological and histometric analysis .....	44
2.3.8 Statistical analysis .....	45
2.4 Results .....	45
2.4.1 Histological and histometric analysis of Periodontal Disease .....	45
2.4.2 Anxiety levels in rats subjected to ELS and PD .....	48
2.5 Discussion .....	49
2.6 References .....	52
ANEXOS .....	59