

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado a partir de 06/06/2021.

GIOVANNA BIGNOTO MINHOTO

**ESTIMULAÇÃO DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL PELO
ESTRESSE CRÔNICO E SEU EFEITO NA PROGRESSÃO DA LESÃO
PERIAPICAL**

Dissertação 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 MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

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

Orientadora: Profa. Titular Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2019

BANCA EXAMINADORA

Marcia Carneiro Valera (Orientador)

Universidade Júlio de Mesquita Filho

Instituto de Ciência e Tecnologia

São José dos Campos

Luana Marotta Reis de Vasconcelos

Universidade Júlio de Mesquita Filho

Instituto de Ciência e Tecnologia

São José dos Campos

Mariella Vieira Pereira Leão

Universidade de Taubaté (Unitau)

São José dos Campos, 06 de Dezembro de 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Enio Salim Minhoto e Elci Aparecida Bignoto**, que com tanto sacrifício investiram na minha formação, permitindo que eu pudesse escolher os caminhos para a minha carreira. Que incansavelmente ouviram minhas queixas, sofrimentos e também minhas alegrias. Acompanharam de perto toda essa jornada, me dando apoio financeiro e principalmente apoio emocional.

À minha irmã **Amanda Bignoto Minhoto**, que sempre esteve ao meu lado, mostrando-se ser muito além de minha irmã, minha melhora amiga, me acompanhando por toda vida.

Amo-os infinitamente e tenham certeza que não teria chegado até aqui sem vocês.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço infinitamente à minha querida orientadora, Prof. Tit. Marcia Carneiro Valera, por ter confiado em mim e ter me escolhido para ser sua orientada. A senhora acreditou em mim, até mesmo quando eu não acreditava, me incentivou quando eu já achava não aguentar mais. A senhora foi além de uma orientadora, foi uma mãe, que com todo carinho me deu conselhos, tentando me mostrar as melhores escolhas. Agradeço por toda a dedicação esforço. Espero um dia chegar perto de ser uma profissional como a senhora.

AGRADECIMENTO

Agradeço a **Deus** pela oportunidade, por me colocar sempre na hora certa e no lugar certo, por me guiar em todas as escolhas. Por sempre atender aos meus pedidos e quando não atendidos, traçando caminhos ainda mais bonitos. Aos meus pais **Enio e Elci** e minha irmã **Amanda**, que me incentivaram ao longo de toda minha jornada, desde a graduação até a decisão de continuar na vida acadêmica. Vocês não fazem ideia do quão importante é o apoio de vocês. Agradeço por tanta paciência comigo nos momentos difíceis e nos momentos em que não pude estar presente para me dedicar ao mestrado.

Aos meus padrastos **Vagner e Simone** que carinhosamente acompanharam toda a jornada e tornaram-na mais leve.

Àos meus amigos de Ensino Médio em Taubaté, **Marina, Amanda, Marcelle, Renata, Flávia, Thomas, Bruno, Nathalia e Gabriel**, que mesmo longe fizeram-se tão presentes, me apoiando em cada decisão. Agradeço infinitamente por tornarem minha jornada mais leve.

Aos meus amigos da pós-graduação, em especial **Amjad, Esteban, Bruna, Cassia e Rayana** que me acolheram de braços abertos, mesmo que difícil inicialmente, vocês se tornaram minha família.

À minha companheira de pesquisa em animais, **Rayana**, que com tanto carinho e paciência me ensinou tudo que sabia sobre o biotério, que me acolheu a cada momento difícil, que muitas vezes me mostrou as soluções dos meus problemas.

Saiba que você é uma irmã pra mim.

Às minhas companheiras de apartamento **Lais e Victória**, que aguentaram meus surtos ao longo desses dois anos, que me deram tanto apoio e que se tornaram grandes amigas. Espero leva-las comigo para o resto da vida.

À professora **Luana**, que me ensinou tanto sobre a pesquisa, que confiou em mim e me deu as melhores oportunidades. Obrigada por me auxiliar sempre que preciso mesmo não sendo mais minha orientadora. Meu carinho e admiração por você só crescem.

Às alunas de iniciação **Jessica, Carol, Itza, Ana Luiza**, que sempre estavam prontas a me ajudar quando necessário.

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos- Universidade estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, através de sua diretora **Prof. Dra.**

Rebeca Di Nicoló, e ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Restauradora,
sob coordenação do **Prof. Adj. Alexandre Luiz Souto Borges**.

À **Capes** pela concessão de bolsa de mestrado e ao auxílio pesquisa

Ao **CNPQ** pelo auxílio a pesquisa (Processo 431807/2016-7)

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP** que

concedeu bolsa de mestrado (Processo n^o 2018/12438-4).

À todos que direta ou indiretamente auxiliaram na execução deste trabalho
e também pessoalmente nesta jornada.

Muito obrigada!

"A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê."

Arthur Schopenhauer

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Lesão Periapical	16
2.2 Estresse Crônico e perda óssea	19
2.3 Avaliação microtomográfica	22
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Procedimento de pesagem dos animais	28
4.2 Indução da Periapicopatía	28
4.3 Indução do estresse crônico	30
4.4 Eutanásia e coleta das amostras	31
4.5 Análise da indução do estresse pelo teste de radioimunoensaio	32
4.6 Análise microtomográfica da estrutura óssea periapical por microtomografia computadorizada	32
4.7 Análise Histológica da região periapical	35
4.8 Análise imuno-histoquímica da expressão de RANKL e OPG	38
4.9 Análise estatística	39
5 RESULTADO	40
5.1 Peso dos animais	40
5.2 Níveis séricos de corticosterona	41
5.3 Análise Microtomográfica	43
5.4 Análise Histomorfométrica	44
5.5 Análise Imunohistoquímica de RANKL/OPG	49
6 DISCUSSÃO	52
7 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO	66

Minhoto GB. Estimulação do eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal pelo estresse crônico e seu efeito na progressão da lesão periapical. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

Uma vez que o estresse crônico pode estimular excessivamente o sistema nervoso simpático, levando a uma diminuição da resposta imune, favorecendo a perda óssea frente a um processo inflamatório, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do estresse crônico na progressão da lesão periapical induzida e o melhor tempo para avaliação da progressão desta lesão. Quarenta e oito ratos Wistar foram submetidos à modelo animal de indução da lesão periapical através da exposição da cavidade pulpar dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo ao meio bucal. Os animais foram divididos em 2 grupos: com estresse (E) e sem estresse (SE), que foram subdivididos em 3 subgrupos de acordo com o período de avaliação da progressão da lesão periapical (n=8): grupo estresse em 14 dias de formação de lesão periapical (E14); estresse e 21 dias de formação de lesão periapical (E21); estresse e 28 dias de formação de lesão periapical; sem estresse e 14 dias de formação de lesão periapical (SE14); sem estresse e 21 dias de formação de lesão periapical (SE28); sem estresse e 28 dias de formação de lesão periapical (SE28). Os grupos de estresse (E) começaram a ser submetidos ao estresse crônico 21 dias antes de iniciar a indução da lesão periapical e foram mantidos nesta condição de estresse durante todo o experimento. Foram realizadas as seguintes análises: a) peso dos animais no início e ao final do experimento; b) nível de corticosterona sanguínea para confirmação do estresse; c) microtomografia para avaliação da progressão da lesão; d) Análise histológica e histomorfométrica; d) Imunoistoquímica para avaliar expressão de RANKL e OPG. Os dados foram avaliados pelo software Graphpad prism 6 utilizando o teste Two Way Anova. A partir dos resultados obtidos observou-se um menor ganho de peso nos grupos estressados em relação aos não estressados. A lesão mostrou-se significativamente maior no grupo estressado com 21 dias de lesão periapical. Nenhuma diferença estatística foi observada em relação ao infiltrado inflamatório, uma vez que todos os grupos apresentaram infiltrado inflamatório moderado. Em relação a extensão da lesão por meio da avaliação histomorfométrica, observou-se que a lesão era significativamente maior nos animais estressados do que nos não estressados no período de 21 dias. Através da imunohistoquímica não foi observado diferença significativa na expressão de RANKL e OPG ($p < 0.05$). Conclui-se que o estresse crônico influencia na formação da lesão periapical em ratos Wistar, aumentando a perda óssea e que o melhor período para esta análise é de 21 dias de progressão da lesão periapical induzida em ratos.

Palavras-chave: Lesão Periapical. Perda óssea. Estresse.

Minhoto, GB. *Hypothalamus-pituitary-adrenal axis stimulation by chronic stress and its effect in apical periodontitis progression [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.*

ABSTRACT

Since chronic stress may excessively stimulate the sympathetic nervous system, leading to a decreased immune response, favoring bone loss in the face of an inflammatory process, the aim of this study was to evaluate the effect of chronic stress on the progression of induced periapical injury and the best time to evaluate the progression of this lesion. Forty-eight Wistar rats were submitted to an animal model of induction of periapical lesion by exposing the right and left lower first molar pulp cavity to the oral environment. The animals were divided into 2 groups: with stress (E) and without stress (SE), which were subdivided into 3 subgroups according to the period of evaluation of periapical lesion progression (n = 8): stress and 14 days of periapical lesion formation (E14); stress and 21 days of periapical lesion formation (E21); stress and 28 days of periapical lesion formation; without stress and 14 days of periapical lesion formation (SE14); without stress and 21 days of periapical lesion formation (SE21); without stress and 28 days of periapical lesion formation (SE28). Stress groups (E) began to undergo chronic stress 21 days before the induction of periapical lesion began and were maintained in this stress condition throughout the experiment. The following analyzes were performed: a) weight of the animals at the beginning and end of the experiment; b) blood corticosterone level for stress confirmation; c) microtomography to evaluate the progression of the lesion; d) Histological and histomorphometric analysis; e) Immunohistochemistry to evaluate RANKL and OPG expression. Data were evaluated by Graphpad prism 6 software using the Two Way Anova test. From the results obtained it was observed a smaller weight gain in the stressed groups in relation to the non stressed ones. The lesion was significantly higher in the stressed group with 21 days of periapical lesion. No statistical difference was observed in relation to the inflammatory infiltrate, since all groups presented moderate inflammatory infiltrate. Regarding the extension of the lesion through histomorphometric evaluation, it was observed that the lesion was significantly larger in stressed animals than in non-stressed animals in the 21-day period. Through immunohistochemistry no significant difference was observed in the expression of RANKL and OPG (p <0.05). It is concluded that chronic stress influences the formation of periapical lesion in Wistar rats, increasing bone loss and that the best period for this analysis is 21 days of progression of induced periapical lesion in rats.

Keywords: *Apical periodontitis. Bone loss. Stress.*

1 INTRODUÇÃO

Lesões periapicais são formadas em decorrência da infecção presente no interior do canal radicular e é identificada através da rarefação óssea periapical visível radiograficamente. Estas lesões são resultantes das reações locais de defesa imune e inflamatórias contra os agentes bacterianos, levando à uma perda óssea na região periapical (Kawashima et al., 1999). A região da lesão é representada por acúmulo de células inflamatórias e imunes (Stashenko et al., 1992) responsáveis por evitar a disseminação da infecção, mantendo-a no sistema de canais radiculares, mas também, contribuindo para a patogênese das lesões periapicais (Stashenko et al., 1990).

Alguns fatores como diabetes melitus e tabagismo podem interferir nas respostas imune e inflamatória, tendo como consequência a progressão da perda óssea periodontal (Grossi et al., 1994; Preshaw e Bisset 2013;). Fatores psicossociais, tais como a depressão e o estresse tem sido relacionado com a progressão da doença periodontal. No entanto, o mecanismo pelo qual os fatores emocionais atuam levando ou favorecendo a perda óssea, ainda não é bem elucidado (Boyapati, Wang, 2000; Sabbah et al., 2011).

O estresse é caracterizado por ser uma reação do organismo frente à uma ameaça potencial ou real que requer mudanças comportamentais (Joels e Baram 2009). Apesar do estresse ser uma reação fisiológica, em excesso pode trazer malefícios ao organismo, pois causa estimulação excessiva do sistema nervoso simpático que por sua vez leva a uma diminuição da resposta imune (Lu et al., 2014). Embora, as bactérias estejam relacionadas a etiopatogênia das doenças periodontais, a gravidade da doença não é ditada apenas pela presença das bactérias e sim pela resposta imune e inflamatória individual. Uma revisão sistemática realizada por Peruzzo et al. em 2007 comprovou a relação entre o aumento da perda óssea periodontal e o estresse crônico. Sendo assim, estresse não é um fator causal da doença periodontal, porém é um fator modulador da patofisiologia da doença (Gasperic, 2002). Porém, até o momento não há estudos que correlacionem a perda óssea periapical com o estresse.

O estresse crônico produz ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrena(HPA) e do Sistema Nervoso Simpático (SNS) (Gasperic et al., 2002). Durante a ativação do eixo hipotálamo há liberação do fator liberador de corticotropina, que atinge a hipófise anterior, onde será secretado o hormônio cortisol (Breivik et al., 1996) bem como as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) (Thaker et al., 2006). As catecolaminas são catalisadas pela enzima tirosina hidroxilase, que é responsável por fazer a conversão das catecolaminas em noradrenalina e adrenalina (Katori et al., 2012). Estas moléculas se ligam aos seus receptores que são conhecidos como receptores adrenérgicos e essa ligação resulta da estimulação do sistema nervoso simpático (Venkatakrishnan, 2013; Rasmussen, 2011; Lu, 2014), causando inúmeros prejuízos para o organismo, como o aumento da perda óssea. Porém, o mecanismo como isso ocorre ainda não é bem claro.

Acredita-se que o número elevado de citocinas, como IL-1, IL-6, IL-11, IL-7 e TNF α , aumenta a taxa de osteoclastogênese, que por sua vez aumentam a expressão de RANKL/ RANK/ OPG (kassem, 2015). Estas citocinas são liberadas na região periapical em resposta à infecção pulpar por fibroblastos (Kawashima et al., 1996). Assim, TNF α , IL-1 e IL-6 estimulam a diferenciação osteoclástica de uma forma sinérgica e aumentam a produção de RANKL e OPG (Ragab, 2002; Kwan, 2004). Ou seja, citocinas pró inflamatórias como, IL-1, IL-6 e TNF α estão associadas ao aumento da produção do receptor ativador do fator nuclear Kappa-B ligante (RANKL), que é a proteínas que regula a osteoclastogênese (Da silva et al., 2012). Além disto o TNF α , modula RANKL através de um mecanismo autócrino (Zou, 2001; Kobayashi, 2000), sendo que a reabsorção óssea está ligada a este mecanismo RANKL/ RANK/ OPG (receptor ativador do fator nuclear Kappa- β / ligante do receptor nuclear Kappa- β / osteoprotegerina). A ligação de RANK com RANKL impulsiona a diferenciação dos pré-osteoclastos, causando então a reabsorção óssea (Alliston, Derynck, 2002). OPG é um receptor o qual pode-se ligar a RANK-L e inibir a osteoclastogênese, que é resultante da ligação entre RANKL e RANK, preservando a integridade óssea (Alliston, Deryn CK, 2002). Este mecanismo está ligado a regulação da atividade osteolítica em condições normais, as alterações dessas ligações estão associada a perda óssea presente em algumas patologias (González Galván, 2018). A expressão de RANKL e OPG foi demonstrada tanto em ratos como em humanos com lesão periapical, sugerindo que o sistema RANKL/

OPG tem um papel fundamental na progressão das lesões periapicais (Vernal et al., 2007; Kawashima et al., 2007; Menezes et al., 2008;).

Muitos estudos vem sendo realizados para se estudar a influência do estresse crônico na progressão da perda óssea em casos de periodontite, como no estudo de Lu et al. (2014), que comparam a perda óssea em ratos após indução da periodontite com e sem estresse, observando que a perda óssea nos ratos estressados foi significativamente maior do que nos não estressados, sugerindo que o estresse e a ativação excessiva do sistema nervoso simpático podem estar relacionados a gravidade da doença.

Portanto, observou-se a correlação entre o estresse e a perda óssea, principalmente relacionada as periodontites. Pesquisa anterior realizada pelo nosso grupo (Fapesp 2016/05821-0), avaliou a lesão periapical frente ao estresse. Entretanto, observamos que os resultados obtidos com a metodologia proposta não foram conclusivos, um vez que o estresse iniciava junto com a indução da lesão e também porque não se avaliou o desenvolvimento da lesão em diferentes períodos. Assim, nesta pesquisa as lesões serão induzidas em animais que já estão sendo submetidos ao estresse e avaliará a progressão destas lesões em diferentes períodos de tempo, podendo elucidar a relação entre o estresse e as periapicopatias, bem como o melhor tempo para avaliar este tipo de lesão.

7 CONCLUSÃO

Após análise dos resultados do presente estudo conclui-se que:

- a) O estresse crônico tem influência no tamanho da lesão periapical de ratos Wistar;
- b) O estresse crônico não influencia no perfil inflamatório periapical nas lesões;
- c) O período de 21 dias é o melhor período para avaliação do efeito do estresse na progressão da lesão periapical;
- d) Há uma correlação nos resultados obtidos entre microtomografia e análise histológica.

¹REFERÊNCIAS*

Aksoy U, Savtekin G, Sehirli AO, Kermeoglu F, Kalender A, Ozkayalar H, et al.. Effects of alpha-lipoic acid therapy on experimentally induced apical periodontitis: a biochemical, histopathological and micro-CT analysis. *Int Endod J*. 2019 Mar; Doi: 10.1111/iej.13121.

Alliston T, Derynck R. Interfering with bone remodeling. *Nature*. 2002;416(6882): 686-687 Doi:10.1038/416686.

Black PH. The inflammatory consequences of psychologic stress: relationship to insulin resistance obesity, atherosclerosis and diabetes mellitus, type II. *Med Hypotheses*. 2006;67(4):879-91. Doi:10.1016/j.mehy.2006.04.008. PubMed PMID 16781084

Blaschke M, Koepp R, Cortis J, Komrakova M, Schieker M, Hempel U, et al. IL-6, IL-1 β , and TNF- α only in combination influence the osteoporotic phenotype in Crohn's patients via bone formation and bone resorption. *Adv Clin Exp Med*. 2018 Jan;27(1):45-56. doi: 10.17219/acem/67561. PubMed PMID: 29521042.

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141. Review. PubMed PMID: 20533309.

Boyapati L, Wang HL. The role of stress in periodontal disease and wound healing. *Periodontol 2000*. 2007;44:195-210. Doi: 10.1111/j.1600-0757.2007.00211.x. PubMed PMID: 17474934.

Breivik T, Thrane PS, Murison R, Gjermo P. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *Eur J Oral Sci*. 1996;104:327-34.

Cintra LT, Samuel RO, Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Bomfim SR. et al. Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. *Int Endod J*. 2014;47:228-37. Doi: 10.1111/iej.12136.

Da Silva R, Ferreira P, De Rossi A, Nelson-Filho P, Silva L. Toll- Like receptor 2 Knockout mice showed increased periapical lesion size and osteoclast number. *J Endod*. 2012;38(6):903-13. Doi:10.1016/j.joen.2012.03.017.

¹ Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Jan 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htm

de Medeiros Vanderlei JM, Messoria MR, Fernandes PG, Novaes AB Jr, Palioto DB, de Moraes Grisi MF, Scombatti de Souza SL, Gerlach RF, Antoniali C, Taba M Jr. Arterial hypertension perpetuates alveolar bone loss. *Clin Exp Hypertens*. 2013;35(1):1-5. doi: 10.3109/10641963.2012.683969. Epub 2012 May 9. PubMed PMID: 22571505.

de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol*. 2014 Mar;85(3):465-77. doi: 10.1902/jop.2013.130225. Epub 2013 Jun 27. PubMed PMID: 23805811.

De Oliveira KM, da Silva RA, Kuchler EC, de Queiroz AM, Nelson Filho P, da Silva LA. Correlation Between Histomorphometric and Micro-computed Tomography Analysis of Periapical Lesions in Mice Model. *Ultrastruct Pathol*. 2015 May;39(3):187-91. Doi: 10.3109/01913123.2014.975389.

Di Loreto DJ. Comparing Stress Responses in Generalized Anxiety Disorder vs Non-Clinical Populations: a Cortisol and Alpha-Amylase Study [tese]. University of Tennessee; 2013.

Fan R, Sun B, Zhang CF, Lu YL, Xuan W, Wang QG, et al. Receptor activator of nuclear factor kappa B Ligand and osteoprotegerin expression in chronic apical periodontitis: possible association with inflammatory cells. *Chin Med J*. 2011 Jul;124(14):2162-6. PubMed PMID: 21933620.

Fan R, Zhang CF, Gao Y. Expression of receptor activator of nuclear factor Kappa B ligand and osteoprotegerin in chronic apical periodontitis. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2008 Feb 18;40(1):39-42. Chinese. PubMed PMID: 18278135.

Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res*. 1989 Feb;4(1):3-11. PubMed PMID: 2718776.

Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Skaleric U. Influence of restraint stress on ligature-induced periodontitis in rats. *Eur J Oral Sci*. 2002 Apr;110(2):125-9. PubMed PMID: 12013555.

Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol*. 1999 Jul; 70(7):711-23. Doi: 10.1902/jop.1999.70.1.100. PubMed PMID: 10440631.

Gomes ESB, Farias LC, Silveira LH, Jesus CÍ, Rocha RGD, Ramos GV, et al. Conditioned fear stress increases bone resorption in apical periodontitis lesions in Wistar male rats. *Arch Oral Biol*. 2019 Jan;97:35-41. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.10.004. Epub 2018 Oct 10. PubMed PMID: 30339914.

González-Galván MC, Mosqueda-Taylor A, Bologna-Molina R, Setien-Olarra A, Marichalar-Mendia X, Aguirre-Urizar JM. Evaluation of the osteoclastogenic process associated with RANK / RANK-L / OPG in odontogenic myxomas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018 May 1;23(3):e315-e319. doi: 10.4317/medoral.22372. PubMed PMID: 29680857; PubMed Central PMCID: PMC5945246.

Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, et al. Assessment of risk for periodontal disease. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol*. 1994 Mar;65(3):260-7. Doi 10.1902/jop.1994.65.3.260. PubMed PMID: 8164120.

Habermann B, Eberthardt C, Feld M, Zichner L, Kuth A. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP5b) as a maker of osteoclast activity in the early phase cement less total hip replacement. *Acta Othop*. 2007;78:221-5.

Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Vaananen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab*. 2006;52:499-509.

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

Heim C, Nemeroff CB. The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. *Biol Psychiatry*. 1999;46:1509-22.

Janckila AJ, Takahashi K, Sun SZ, Yam LT. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clin Chem*. 2001;47:74-80.

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

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965 Sep;20:340-9. PubMed PMID:14342926.

Kaneko T, Zaw SYM, Sueyama Y, Katsube K, Kaneko R, Nor J, et al. Inhibition of Nuclear Factor Kappa B Prevents the Development of Experimental Periapical Lesions. *J Endod*. 2019 Feb;45(2):168-73. Doi:10.1016/j.joen.2018.10.006.

Kassem A, Henning P, Lundberg P, Souza PP, Lindholm C, Lerner UH. *Porphyromonas gingivalis* Stimulates Bone Resorption by Enhancing RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) through Activation of Toll-like Receptor 2 in Osteoblasts. *J Biol Chem*. 2015 Aug 14;290(33):20147-58. doi:10.1074/jbc.M115.655787. Epub 2015 Jun 17. PubMed PMID: 26085099; PubMed Central PMCID: PMC4536425

Katori Y, Shibata S, Kawase T, Cho BH, Murakami G. Transient appearance of tyrosine hydroxylase immunoreactive cells in the midline epithelial seam of the human fetal secondary palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2012;49:414-24.

Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *J Endod*. 1996; 22:311-6.

Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol*. 1999;44(1):55-66.

Kawashima N, Suzuki N, Yang G, Ohi C, Okuhara S, Nakano-Kawanishi H, et al. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007; May;103(5):707-11. Epub 2007 Feb 28. PubMed PMID: 17336108

Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL/RANK interaction. *J Exp Med*. 2000;191:275-86.

Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF α /IL-1: Interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15:49-60.

Li M, Yao W, Li S, Xi J. Norepinephrine induces the expression of interleukin-6 via β -adrenoreceptor-NAD(P)H oxidase system -NF- κ B dependent signal pathway in U937 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 May 15;460(4):1029-34. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.172. Epub 2015 Apr 2. PubMed PMID:25843793.

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 Model Med*. 2014 Oct 17;46:e118. Doi:10.1038/emm.2014.65. Pubmed PMID: 25323788.

Marin MT, Cruz FC, Planeta CS. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol Behav*. 2007 Jan 30;90(1):29-35. Epub 2006 Oct 4. PubMed PMID: 17023009.

Martins CM, Sasaki H, Hirai K, Andrada AC, Gomes-Filho JE. Relationship between hypertension and periapical lesion: an in vitro and in vivo study. *Braz Oral Res*. 2016 Oct 10;30(1); e78. Doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0078.

Menezes R, Bramante CM, da Silva Paiva KB, Letra A, Carneiro E, Zambuzzi W, et al. Receptor activator NF- κ B ligand and osteoprotegerin protein expression. In human periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Sep;102(3):404-9. Doi:10.1016/j.tripleo.2005.10.054.

Menezes R, Garlet TP, Letra A, Bramante CM, Campanelli AP, Figueira Rde C, Sogayar MC, Granjeiro JM, Garlet GP. 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*. 2008 Aug;34(8):932-8. doi: 10.1016/j.joen.2008.05.002. PubMed PMID: 18634923; PubMed Central PMCID: PMC2719712.

Moller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res*. 1981 Dec;89(6):475-84.

Nance DM, Sanders VM. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav Immun*. 2007 Aug;21(6):736-45. Doi: 10.1016/j.bbi.2007.03.008. PubMed PMID: 17467231.

Palmqvist P, Lundberg P, Persson E, Johansson A, Lundgren I, Lie A, et al. Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2006 Feb 3;281(5):2414-29. Epub 2005 Oct 25. PubMed PMID: 16251181.

Park CH, Abranson ZR, Taba JrM, Jin Q, Chang J, Kreider JM, et al. Three-Dimensional Micro-Computed Tomographic Imaging of alveolar Bone in Experimental bone Loss or Repair. *J Periodontol* 2007;78:273-81.

Peruzzo DC, Benatti BB, Ambrosano GM, 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 Aug; 78(8):1491-504. Doi: 10.1902/jop.2007.060371. PubMed PMID: 17668968.

Peruzzo DC, Benatti BB, Antunes IB, Andersen ML, Sallum EA, Casati MZ, et al. Chronic stress may modulate periodontal disease: a study in rats. *J Periodontol*. 2008;79:697-704.

Preshaw PM, Bissett SM. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2013 Dec;42(4):849-67. Doi: 10.1016/j.ecl.2013.05.012. PubMed PMID: 24286953.

Radahmadi M, Alaei H, Sharifi MR, Hosseinei N. Effects of different timing of stress on corticosterone, BDNF and memory in male rats. *Physiol Behav*. 2015 Feb;139:459-67. Doi: 10.1016/j.physbeh.2014.12.004. Epub 2014.

Ragab AA, Nalepka JL, Bi Y, Greenfield EM. Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal calvarial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283:C679-87.

Rasmussen SG, Devree BT, Zou Y, Kruse AC, Chung KY, Kobilka TS, et al. Crystal structure of the 2 adrenergic receptor-gs protein complex. *Nature*. 2011; 477:549-55.

Rechenberg DK, Bostanci N, Zehnder M, Belibasakis GN. Periapical fluid RANKL and IL-8 are differentially regulated in pulpitis and apical periodontitis. *Cytokine*. 2014 Sep;69(1):116-9. Doi: 10.1016/j.cyto.2014.05.014. Epub 2014 Jun 14. PubMed PMID: 25022970.

Rosania AE, Low KG, McCormick CM, Rosania DA. Stress, depression, cortisol, and periodontal disease. *J periodontol*. 2009 Feb;80(2):260-6. Doi: 10.1902/jop.2009.080334. PubMed PMID: 19186966.

Sabbah W, Tsakos G, Chandola T, Newton T, Kawachi I, Sheiham A, et al. The relationship between social network, social support and periodontal disease among older Americans. *J Clin Periodontol*. 2011 Jun;38(6):547-52. Doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.0173.x. PubMed PMID: 21362014.

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 Nov;21(8):2613-2618. doi: 10.1007/s00784-017-2062-x. Epub 2017 Mar 6. PubMed PMID: 28261746; PubMed Central PMCID: PMC5632344.

Saritekin E, Ureyen Kaya B, Asci H, Ozmen O. Anti-inflammatory and antiresorptive functions of Melatonin on experimentally induced periapical lesions. *Int Endod J*. 2019 May Doi: 10.1111/iej.13138.

Scarpato RK, Dondoni L, Böttcher DE, Grecca FS, Figueiredo JA, Batista EL Jr. Apical periodontium response to enamel matrix derivative as an intracanal medication in rat immature teeth with pulp necrosis: radiographic and histologic findings. *J Endod*. 2012 Apr;38(4):449-53. doi: 10.1016/j.joen.2011.12.041. Epub 2012 Jan 31. PubMed PMID: 22414828.

Segura-Egea JJ, Martín-González J, Castellanos-Cosano L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. *Int Endod J*. 2015 Oct;48(10):933-51. doi: 10.1111/iej.12507. PubMed PMID: 26174809.

Simch RP, Gaio EJ, Rosing CK. Effect of body weight in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Acta Odontol Scand*. 2008 Jun;66(3):130-4. doi: 10.1080/00016350802004672. PubMed PMID: 18568470.

Siqueira JF, Rôças IN. Present status and future directions in endodontic microbiology. *Endod Topics*. 2014;30:3-22. doi:10.1111/etp.12060.

Soletti AC, Gaio EJ, Rosing CK. Effect of neonatal clomipramine in the pathogenesis of ligature-induced periodontitis in Lewis rats. *Acta Odontol Scand*. 2009;67(2):94-8. doi: 10.1080/00016350802683822. PubMed PMID: 19169913.

Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod*. 1992 Sep;18(9):422-6. Doi: 10.1016/S0099-2399(06)80841-1. PubMed PMID: 9796508.

Stashenko P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol*. 1990 Jun;6(3):89-96. Review. PubMed PMID: 2079017.

Suzuki N, Takimoto K, Kawashima N. Cathepsin K Inhibitor Regulates Inflammation and Bone Destruction in Experimentally Induced Rat Periapical Lesions. *J endod*. 2015 Sep;41(9):1474-9. Doi:10.1016/j.joen.2015.04.013.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000 Sep 1; 289(5484):1504-8. PubMed PMID: 10968780.

Thaker PH, Han LY, Kmat AA, Arevalo JM, Takahashi R, Lu C, et al. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med*. 2006 Aug;12(8):939-44. Doi: 10.1038/nm1447. PubMed PMID:16862152.

Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:795-823. Doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064753. PubMed PMID:11861618.

Trisi P, Rebaudi A, Calvari F, Lazzara RJ. Sinus graft with biogran, autogenous bone, and PRP: a report of three cases with histology and micro-CT. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2006 Apr;26(2):113-25. PubMed PMID:16642900.

Tsukii K, Shima N, Mochizuki S, Yamaguchi K, Kinoshita M, Yano K, Shibata O, Udagawa N, Yasuda H, Suda T, Higashio K. Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, prostaglandin E₂, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 May 19;246(2):337-41. PubMed PMID: 9610359.

Venkatakrishnan A, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 2013;494:185-94.

Vernal R, Dezerega A, Dutzan N et al. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral Dis*. 2006;12:283-9.

Wayama MT, Yoshimura H, Ohba S, Yoshida H, Matsuda S, Kobayashi J, et al. Diminished Progression of Periapical Lesions with Zoledronic Acid in Ovariectomized Rats. *J Endod*. 2015 Dec;41(12):2002-7. Doi: 10.1016/j.joen.2015.08.029.

Wilkie JR, Giger ML, Chinander MR, Vokes TJ, Li H, Dixon L, Jaros V. Comparison of radiographic texture analysis from computed radiography and bone densitometry systems. *Medical Physics*. 2004;31(4):882-91.

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

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 Jan;40(1):56-62. doi:10.1016/j.joen.2013.09.033. Epub 2013 Nov 6. PubMed PMID: 24331992.

Zou W, Hakim I, Tschoep K, Endres S, Bar-Shavit Z. Tumor necrosis factor- α mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism. *J Cell Biochem* 2001;83:70-83.

Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 1986 Mar;24(3):525-9. PubMed PMID: 2871560.

von Stechow D, Balto K, Stashenko P, Müller R. Three-dimensional quantitation of periradicular bone destruction by micro-computed tomography. *J Endod*. 2003 Apr;29(4):252–6. doi: 10.1097/00004770-200304000-00005. PubMed PMID: 12701773.

Scales BS, Huffnagle GB. The microbiome in wound repair and tissue fibrosis. *J Pathol*. 2013 Jan;229(2):323-31. doi: 10.1002/path.4118. PubMed PMID: 23042513.

Semenoff-Segundo A, Delle Vedove Semenoff TA, Borges ÁH, Pedro FL, Caporossi LS, Bosco ÁF. The influence of chronic stress imposed on pregnant rats on the induced bone loss in their adult offspring. *Arch Oral Biol*. 2012 May;57(5):477-82. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.10.018. Epub 2011 Dec 5. PubMed PMID: 22153316.

Semenoff TA, Rosa Júnior A, Borges ÁH, Porto AN, Caporossi C, Semenoff Segundo A. Effect of chronic stress in newborn rats on the progression of ligature-induced-periodontitis in adulthood. *Acta Cir Bras*. 2013 Sep;28(9):652-6. PubMed PMID: 24000058.

Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, Guimarães FS. Animal models of anxiety disorders and stress. *Braz J Psychiatry*. 2013;35 Suppl 2:S101-11. doi: 10.1590/1516-4446-2013-1139. Review. PubMed PMID: 24271222.

Bezerra MC, Carvalho JF, Prokopowitsch AS, Pereira RM. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Feb;38(2):161-70. Epub 2005 Feb 15. Review. PubMed PMID: 15785827.

ANEXO A - Comitê de Ética em pesquisa aprovado



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



INSTITUTO DE TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
UNESP

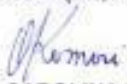


CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 11/2018, intitulado: - "Estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pelo estress crônico e seu efeito na progressão da lesão periapical." sob a responsabilidade de **MARCIA CARNEIRO VALERA**, tendo com colaboradoras :- Mestranda **GIOVANA MINHOTO** 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 ☒ Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	29/06/2018 a 30/11/2019
Espécie/inhagem/raça	Rato heterogêneo Wistar
Nº de Animais	48
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