



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

MARIANA PAGLIUSI JUSTO

*Influência do estresse crônico na resposta tecidual de
cimentos endodônticos*

ARAÇATUBA - SP
2022

MARIANA PAGLIUSI JUSTO

*Influência do estresse crônico na resposta tecidual de
cimentos endodônticos*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Endodontia.

Orientador: Prof. Assoc. Luciano Tavares
Angelo Cintra

Coorientador: Prof. Assoc. Daniel Galera
Bernabé

ARAÇATUBA - SP
2022

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

J96i Justo, Mariana Pagliusi.
Influência do estresse crônico sobre a resposta tecidual de cimentos endodônticos / Mariana Pagliusi Justo. . - Araçatuba, 2023
67 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Luciano Tavares Ângelo Cintra
Coorientador: Prof. Daniel Galera Bernabé

1. Materiais dentários 2. Biomineralização 3. Inflamação
4. Corticosterona I. T.

Black D24
CDD 617.67

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha família: minha mãe, Mônica Pagliusi Lopes Justo, ao meu pai, Fábio Antônio Justo e aos meus irmãos, que estiveram ao meu lado em todos os momentos desta jornada, acreditando no meu potencial para a realização dos meus sonhos.

Agradeço ao meu Professor e Orientador, Luciano Tavares Angelo Cintra, pela oportunidade de fazer parte dos seus orientados. Obrigada por ter aceitado acompanhar-me neste projeto. O seu empenho foi essencial para a minha motivação à medida que as dificuldades iam surgindo ao longo do percurso. Obrigada pelo ensinamento e conhecimento compartilhados. O senhor é uma inspiração de profissional!

Ao Professor Daniel Galera Bernabé e sua equipe por compartilhar todo o conhecimento para que a execução deste trabalho fosse possível.

Aos demais professores da Endodontia que sempre estiveram à disposição para contribuir com este estudo.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, à Universidade Estadual Paulista, e ao Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por acreditar em nosso trabalho fomentado nossas pesquisas (Processos n^{os} 2018/18661-7; 2021/03861-3).

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

Leonardo da Vinci

JUSTO, M. P. **Influência do estresse crônico na resposta tecidual de cimentos endodônticos**. 2022. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

Objetivo: Este estudo buscou correlacionar o estresse crônico com a resposta tecidual de diferentes tipos de cimentos endodônticos empregando o modelo ISO 10993-6:2016 para testes de implantação em tecido subcutâneo. Métodos: Foram utilizados 28 ratos Wistar divididos em 2 grupos (n=14): ratos controle (rC) e ratos estressados (rE). Em cada rato foram implantados 4 tubos de polietileno, sendo 1 tubo vazio para Controle, e os demais contendo um dos tipos de cimentos endodônticos selecionados para o estudo (Sealapex®, Endofill®, AH Plus®). Os períodos de avaliação foram de 7 e 30 dias (n=7/tempo). Após a eutanásia foi coletado o sangue para dosagem de corticosterona pelo método ELISA e, em seguida, os tubos e o tecido circundante foram removidos e processados para análise histológica e imunoistoquímica. A inflamação foi avaliada em cortes teciduais corados em H.E e pela marcação imunoistoquímica para IL-6, IL-17, TNF- α , CD8 e CD20; o colágeno, por meio da coloração de Picrosírios red (PSR); a biomineralização, por meio da coloração de von Kossa (vK) e em cortes sem coloração pela luz polarizada (POL), assim como também pela análise da osteocalcina (OCN). Para todos os testes empregados foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Resultados: Observou-se aumento de corticosterona em rE comparado a rC, apenas no período de 7 dias ($p < 0,05$). Animais do grupo rE apresentaram menor ganho de peso corporal comparado aos animais em rC ($p < 0,05$). Na análise histológica em rC aos 7 dias observou-se que o grupo Endofill apresentou infiltrado inflamatório mais intenso comparado ao Controle ($p = 0,031$). Em rE não houve diferença entre os grupos em nenhum período ($p > 0,05$). Comparando a resposta de cada grupo em função da presença ou não do estresse, observou-se que apenas aos 7 dias o grupo controle em rE apresentou infiltrado inflamatório mais intenso que o grupo Controle em rC ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos para IL-6 em nenhuma das comparações e períodos ($p > 0,05$). Para IL-17 em rC, aos 7 dias, o grupo Endofill apresentou infiltrado inflamatório mais intenso comparado ao Controle ($p < 0,05$). Para TNF- α , observou-se aos 7 dias que o grupo controle em rE apresentou maior imunomarcação comparado ao grupo Controle em rC ($p < 0,05$). Para CD8, no período 30 dias observou-se que o grupo AH Plus em rC apresentou maior quantidade de células CD8+ comparado ao AH Plus em rE ($p < 0,05$). Para CD20 em rC, aos 7 dias, foi observado que o grupo Endofill apresentou maior quantidade de células CD20+ quando comparado aos grupos Controle e Sealapex ($p < 0,05$). Em rE aos 7 dias,

foi observado que o grupo Endofill apresentou maior quantidade de células CD20+ quando comparado ao grupo Controle ($p < 0,05$). Aos 7 dias o grupo Controle em rC apresentou maior quantidade de células CD20+ comparado ao grupo Controle em rE ($p < 0,05$). Para PSR, na comparação entre os grupos em rC, aos 7 dias, os grupos Sealapex e Endofill apresentaram maior percentual de fibras imaturas e menor percentual de fibras maduras quando comparados aos grupos Controle e AH Plus ($p < 0,05$). O grupo Controle, Sealapex e Endofill em rE apresentaram maior percentual de fibras imaturas e menor percentual de fibras maduras comparado aos grupos Controle, Sealapex e Endofill em rC ($p < 0,05$). O grupo AH Plus em rE, tanto aos 7 dias quando aos 30 dias apresentou maior percentual de fibras imaturas e menor percentual de fibras maduras comparado ao grupo AH Plus em rC $p < 0,05$. Apenas no grupo Sealapex, tanto em rC quando em rE, foram observadas estruturas coradas em negro na coloração von Kossa, cristais birrefringentes sob luz polarizada e imunomarcção positiva para OCN. Além disso, em rC houve maior imunomarcção para OCN comparado a rE ($p < 0,05$). Conclusão: O estresse crônico influenciou a resposta tecidual de cimentos endodônticos, aumentando o infiltrado inflamatório e retardando o reparo tecidual. Ainda, o estresse crônico reduziu a capacidade de biomineralização do material que possui esta habilidade.

Palavras-chave: Materiais dentários. Inflamação. Biomineralização. Corticosterona.

JUSTO, MP. **Influence of chronic stress on tissue response of endodontic sealers.** 2022. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Objective: This study aimed to correlate chronic stress with the tissue response of different types of endodontic cements using the ISO 10993-6:2016 model for subcutaneous tissue implantation tests. **Methods:** 28 Wistar rats were used, divided into two groups (n=14): control rats (rC) and stressed rats (rE). Four polyethylene tubes were implanted in each rat, 1 empty for control, and the others containing one of the endodontic cements selected for the study (Sealapex®, Endofill® and AH Plus®). The evaluation periods were 7 and 30 days (n=7/time). After euthanasia, blood was collected for corticosterone dosage by the ELISA method, and then the tubes and surrounding tissue were removed and processed for histological and immunohistochemical analysis. Inflammation was assessed in tissue sections stained in H.E. and by immunohistochemical staining for IL-6, IL-17, TNF- α , CD8 and CD20; collagen, by Picrosirius red staining (PSR); biomineralization, by von Kossa staining (vK) and in sections without staining by polarized light (POL), as well as by osteocalcin (OCN) analysis. For all tests employed, a significance level of 5% ($p < 0.05$) was considered. **Results:** An increase in corticosterone was observed in rE compared to rC, only in the 7-day period ($p < 0.05$). Animals in the rE group less body weight gain compared to animals in rC ($p < 0.05$). Histological analysis in rC at 7 days showed that the Endofill group showed more intense inflammatory infiltrate compared to Control ($p = 0.031$). In rE there was no difference between the groups in any period ($p > 0.05$). Comparing the response of each group according to the presence or absence of stress, it was observed that only at 7 days the control group in rE presented a more intense inflammatory infiltrate than the Control group in rC ($p < 0.005$). There was no difference between groups for IL-6 in any of the comparisons and periods ($p > 0.05$). For IL-17 in rC, at 7 days, the Endofill group showed more intense inflammatory infiltrate compared to the Control ($p < 0.05$). For TNF- α , it was observed at 7 days that the control group in rE showed greater immunolabeling compared to the Control group in rC ($p < 0.05$). For CD8, at 30 days, it was observed that the AH Plus group in rC showed a greater amount of CD8+ cells compared to AH Plus in rE ($p < 0.05$). For CD20 in rC, at 7 days, the Endofill group had more CD20+ cells when compared to the Control and Sealapex groups ($p < 0.05$). In rE, at 7 days, it was observed that the Endofill group presented a greater amount of CD20+ cells when compared to the Control group ($p < 0.05$). At 7 days, the Control group in rC presented a greater

amount of CD20+ cells compared to the Control group in rE ($p < 0.05$). For PSR, when comparing the groups in rC, at 7 days, the Sealapex and Endofill groups showed a higher percentage of immature fibers and a lower percentage of mature fibers when compared to the Control and AH Plus groups ($p < 0.05$). The Control, Sealapex and Endofill groups in rE showed a higher percentage of immature fibers and a lower percentage of mature fibers compared to the Control, Sealapex and Endofill groups in rC ($p < 0.05$). The AH Plus group in rE, both at 7 days and 30 days showed a higher percentage of immature fibers and a lower percentage of mature fibers compared to the AH Plus group in rC ($p < 0.05$). Only in the Sealapex group, both in rC and rE, structures stained black in von Kossa staining, birefringent crystals under polarized light and positive immunostaining for OCN were observed. Furthermore, in rC there was greater immunostaining for OCN compared to rE ($p < 0.05$). Conclusion: Chronic stress influenced the tissue response of endodontic sealers, increasing the inflammatory infiltrate and delaying tissue repair. Still, chronic stress reduced the biomineralization capacity of the material that has this ability.

Keywords: Dental Materials. Inflammation. Biomineralization. Corticosterone.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Cimentos endodônticos selecionados para o estudo (AH Plus®, Endofill® e Sealapex®) 19
- Figura 2 - Sequência operatória da implantação de tubos de polietileno na região dorsal do animal 21
- Figura 3 - Partes constituintes do aparelho utilizado para indução do estresse crônico 22
- Figura 4 - Manuseio dos animais e do aparelho: Animal colocado no aparelho (1), ajuste da alavanca para manutenção do animal imobilizado (2) e aspecto final do animal (3) 23
- Figura 5 - Kit ELISA Elabscience 25
- Figura 6 - Confeção dos cortes histológicos do tecido 26
- Figura 7 - Imagens representativas das reações do tecido subcutâneo para rC (a1-a8) e rE (b1-b8) para cada tipo de cimento em 7 dias (a1-a4; b1-4) e 30 dias (a5-a8 a b5-b8). (a1, b1, a5, b5 - Controle; a2, b2, a6, b6 - Sealapex; a3, b3, a7, b7 – Endofill; a4, b4, a8, b8 – AH Plus). (Coloração de Hematoxilina-eosina, 100x) 31
- Figura 8 - IL-6. Imagens representativas das reações do tecido subcutâneo para rC (a1-a8) e rE (b1-b8) para cada tipo de cimento em 7 dias (a1-a4; b1-4) e 30 dias (a5-a8 a b5-b8). (a1, b1, a5, b5 - Controle; a2, b2, a6, b6 - Sealapex; a3, b3, a7, b7 – Endofill; a4, b4, a8, b8 – AH Plus). (IL-6, 1000x) 35
- Figura 9 - IL-17. Imagens representativas das reações do tecido subcutâneo para rC (a1-a8) e rE (b1-b8) para cada tipo de cimento em 7 dias (a1-a4; b1-4) e 30 dias (a5-a8 a b5-b8). (a1, b1, a5, b5 - Controle; a2, b2, a6, b6 - Sealapex; a3, b3, a7, b7 – Endofill; a4, b4, a8, b8 – AH Plus). (IL-17, 1000x) 36
- Figura 10 - TNF- α . Imagens representativas das reações do tecido subcutâneo para rC (a1-a8) e rE (b1-b8) para cada tipo de cimento em 7 dias (a1-a4; b1-4) e 30 dias (a5-a8 a b5-b8). (a1, b1, a5, b5 - Controle; a2, b2, a6, b6 - Sealapex; a3, b3, a7, b7 – Endofill; a4, b4, a8, b8 – AH Plus). (TNF- α , 1000x) 37
- Figura 11 - CD8. Imagens representativas das reações do tecido subcutâneo para rC (a1-a8) e rE (b1-b8) para cada tipo de cimento em 7 dias (a1-a4; b1-4) e 30 dias (a5-a8 a b5-b8). (a1, b1, a5, b5 - Controle; a2, b2, a6, b6 - Sealapex; a3, b3, a7, b7 – Endofill; a4, b4, a8, b8 – AH Plus). (CD8, 1000x) 38
- Figura 12 - CD20. Imagens representativas das reações do tecido subcutâneo para rC (a1-a8) e rE (b1-b8) para cada tipo de cimento em 7 dias (a1-a4; b1-4) e 30 dias (a5-a8 a b5-b8). (a1, b1,

a5, b5 - Controle; a2, b2, a6, b6 - Sealapex; a3, b3, a7, b7 – Endofill; a4, b4, a8, b8 – AH Plus).
(CD20, 1000x) 39

Figura 13 - Imagens representativas da coloração de PSR para identificar a maturação de fibras colágenas em rC (a1-a8) e rE (b1-b8) para cada tipo de cimento em 7 dias (a1-a4; b1-4) e 30 dias (a5-a8 a b5-b8). (a1, b1, a5, b5 - Controle; a2, b2, a6, b6 - Sealapex; a3, b3, a7, b7 – Endofill; a4, b4, a8, b8 – AH Plus). (Coloração de PSR, 400x) 42

Figura 14 - Imagens representativas de von Kossa (à esquerda), luz polarizada (ao centro) e OCN (à direita) para rC (a1-a6) e rE (b1-b6) para o cimento Sealapex em 7 dias (a1-a3; b1-b3) e 30 dias (a4-a6 a b4-b6). von Kossa 100x; Luz Polarizada 100x; OCN 1000x) 45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Células CD8 POSITIVAS em rC e em rE	41
Gráfico 2 - Células CD20 POSITIVAS em rC e em rE	41
Gráfico 3 - Células OCN POSITIVAS em rC e em rE	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nome comercial e composição dos cimentos endodônticos utilizados	19
Tabela 2 - Grupos experimentais conforme a presença do estresse e materiais teste	24
Tabela 3 - Média e desvio padrão (média \pm SD) dos valores da concentração de corticosterona em rC e rE nos períodos experimentais de 7 e 30 dias	30
Tabela 4 - Média e desvio padrão (média \pm SD) dos valores do peso em rC e rE nos períodos experimentais de 7 e 30 dias	30
Tabela 5 - Escores atribuídos para a resposta inflamatória dos grupos Controle e de cimentos endodônticos em rC e rE	34
Tabela 6 - Média da imunorreatividade para CD8 e CD20 em rC e rE nos períodos de 7 e 30 dias	40
Tabela 7 - Média das fibras maduras e imaturas de cimentos endodônticos em rC e rE	43
Tabela 8 - Média da capacidade de mineralização de cimentos endodônticos em rC e rE	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	12
2 OBJETIVOS	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Material.....	18
3.2 Métodos	20
4 RESULTADOS	30
4.1 Concentração de Corticosterona.....	30
4.2 Peso dos Animais	30
4.3 Perfil Inflamatório (H.E. e Citocinas IL-6, IL-17 E TNF- α).....	31
4.4 CD8 e CD20	38
4.5 Maturação do Colágeno.....	42
4.6 Biomineralização – vK, POL and OCN	44
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS	66

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O estresse é um mecanismo fisiológico de defesa do organismo. Os sistemas que atuam no processo adaptativo, os chamados agentes estressores são o sistema nervoso, principalmente o cérebro, e o sistema imunológico (DRAGOȘ; TĂNĂSESCU, 2010), e as principais vias de interação entre esses dois sistemas, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), o sistema nervoso simpático (SNS) e seus componentes pró-inflamatórios, imunológicos e metabólicos (GODOY *et al.*, 2018, MCEWEN *et al.*, 2015).

O cérebro é o órgão base de sinalização para o sistema imunológico e seu papel modulador acontece a partir de vias de regulação neuroimunológica, que quando em desajuste podem ser precursoras de um feedback positivo de amplificação da inflamação (NUSSLOCK; MILLER, 2016). Regiões como amígdala, córtex pré-frontal, hipocampo e núcleo paraventricular do hipotálamo são regiões importantes na resposta a eventos estressores e ao perceberem o estímulo estressor, neurônios amigdalianos propagam sinais para o hipocampo e outras regiões cerebrais, o que resulta numa resposta de luta ou fuga mediado pelo Sistema Nervoso Simpático e eixo HPA (MACCARI; MORLEY-FLETCHER, 2007; MCEWEN *et al.*, 2015). A progressão deste processo se dá do Sistema Nervoso Central para o Sistema Nervoso Periférico onde há a liberação de hormônios como a norepinefrina e concomitante liberação de mediadores inflamatórios e células do sistema imune (DANESE; LEWIS, 2017; MACCARI; MORLEY-FLETCHER, 2007). Este circuito de ameaças neural é bidirecional, ou seja, também flui do SNP para o SNC, onde os biomarcadores da inflamação e hormônios do estresse trafegam até o cérebro onde modulam e sensibilizam regiões e vias neurais relacionadas ao estresse (DANESE; LEWIS, 2017; MACCARI; MORLEY-FLETCHER, 2007; NUSSLOCK; MILLER, 2016).

O desajuste no eixo HPA induzido pelo estresse crônico afeta a resposta neuroendócrina e influência na resposta imunológica, através do aumento da concentração de glicocorticoides, de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (DHABHAR; MCEWEN, 1997; ELENKOV, 2002; KELLER-WOOD, 2015; SPIGA *et al.*, 2014). Assim, podemos considerar que o estresse crônico pode influenciar a resposta inflamatória, exacerbando eventos inflamatórios induzidos por materiais de uso endodônticos.

Em animais, o estresse por restrição tem se mostrado um modelo experimental eficiente, pois permite examinar com eficiência as mudanças nos níveis de hormônios adrenocorticotrópicos e expressão de citocinas (BUYNITSKY; MOSTOFISKY, 2009). Nas

infecções orais o estresse crônico aumentou os níveis de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-10 e IFN- γ) em tecido gengival de ratos (PERUZZO *et al.*, 2008), assim como exacerbou a resposta inflamatória e reabsorção óssea na periodontite apical (MINHOTO *et al.*, 2021). Uma das linhas de pesquisa desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa é a que investiga a relação existente entre materiais dentários e alterações ou condições sistêmicas (CINTRA *et al.*, 2018). Resultados prévios demonstraram que a implantação de tubos de polietileno contendo cimentos endodônticos em tecido subcutâneo de ratos hipertensos tiveram resposta inflamatória mais exacerbada (MARTINS *et al.*, 2016), assim como em animais diabéticos observou-se inibição da produção de osteocalcina e osteopontina frente a materiais reparadores (AZEVEDO QUEIROZ *et al.*, 2018).

As reações teciduais de materiais que entram em contato com os tecidos vivos devem ser verificadas segundo as normas ISO para testes de avaliação das propriedades biológicas. Dentre estes testes, temos o de avaliação do efeito local, utilizando o método de implantação em tecido subcutâneo de ratos (International Organization for Standardization, 2007). Como a resposta inflamatória para todos os tecidos conjuntivos é semelhante, esta é uma técnica adequada para avaliarmos a reação tecidual de um material endodôntico (FARHAD *et al.*, 2011; ORSTAVIK, 1988) A biocompatibilidade pode ser avaliada pela observação do processo inflamatório em cortes teciduais corados com hematoxilina e eosina (H.E.) (CINTRA *et al.*, 2017a; GOMES-FILHO *et al.*, 2009). Por outro lado, a utilização da técnica imunoistoquímica nos oferece a possibilidade de compreendermos os mecanismos celulares e moleculares envolvidos com a resposta inflamatória de forma mais precisa. Os marcadores IL-6, TNF- α e IL-17 são frequentemente utilizados em trabalhos que visam uma maior compreensão de fenômenos que envolvem uma resposta tecidual inflamatória frente a cimentos endodônticos (COSME-SILVA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020).

Também devemos considerar que na resposta ao estresse diferentes citocinas inflamatórias estão envolvidas, pois o sistema imunológico é afetado por meio de um efeito imunossupressor, elevando a taxa de apoptose de linfócitos (ESTERLING; KIECOLT-GLASER; GLASER, 1996) e as concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α) (CHANCELLOR-FREELAND *et al.*, 1995) e de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) (ROHLEDER, 2019; SPIGA *et al.*, 2014).

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pleomórfica que está presente em processos fisiológicos e patológicos incluindo a resposta ao trauma, à infecção e ao desenvolvimento e progressão de inflamação (AZUMA *et al.*, 2014; NIBALI *et al.*, 2012). Sabendo que a

diminuição da IL-6 é um indicativo de redução de inflamação induzidas por cimentos (SILVA *et al.*, 2015), torna-se importante avaliar essa citocina por meio da técnica de imunohistoquímica.

A produção de fator de necrose tumoral (TNF- α) atua de forma importante na resposta ao tecido danificado ou infecção por ter efeito pró-inflamatório inicial, seguido por um efeito regulador nos estágios tardios da inflamação, reduzindo a atividade imune (ZAKHAROVA; ZIEGLER, 2005). Assim, como a IL-6, o TNF- α está relacionado com a resposta inflamatória frente a materiais endodônticos (CHANG *et al.*, 2015, SILVA; ZAIA; PETERS, 2017).

A resposta ao estresse está intrinsecamente ligada à sinalização pró-inflamatória, envolvendo a liberação de TNF- α e IL-6 (BLACK, 1994; CHROUSOS, 1995; DANTZER *et al.*, 1999; MCCANN *et al.*, 1995; VALLIERES; RIVEST, 1999). Tanto o TNF- α quanto a IL-6 são proteínas de fase aguda secretadas na corrente sanguínea em resposta ao desafio imunológico, sendo que o aumento dessas citocinas na ausência de infecção ou tecido lesionado é considerado anormal (DOFFERHOFF *et al.*; 1991, KOJ *et al.*, 1988). Periféricamente, a IL-6 é secretada por macrófagos e monócitos para estimular a diferenciação e proliferação de células B (HODGKIN *et al.*, 1988; MAYER *et al.*, 1991). O TNF- α atua no recrutamento de linfócitos e monócitos, além de estimular células endoteliais a expressar moléculas de adesão e secretar quimiocinas (PFEFFER, 2003; TANSEY; SZYMKOWSKI, 2009). A IL-17, que é secretada principalmente por células T, denominadas Th 17 (GAFFEN, 2011) apresenta-se ativa em respostas inflamatórias, auto-imunes e antimicrobianas à patógenos em uma variedade de doenças infecciosas (SCHENKEIN *et al.*, 2010). Em estudo de nosso grupo de pesquisa, foi verificada a influência da infecção endodôntica e da doença periodontal em função da diabetes na quantificação da IL-17 e sua correlação com o número de neutrófilos (CINTRA *et al.*, 2014).

Assim, o estudo destas citocinas pode revelar uma relação entre aspectos específicos da resposta inflamatória local e sistêmica podendo indicar a influência do estresse na resposta de cimentos endodônticos.

A resposta imunológica inata não específica, é uma resposta rápida a um grande número de estímulos. Suas principais células são os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células Natural Killers (NK). Já a resposta imune adquirida, necessita da ativação de células especializadas, os linfócitos, e de suas moléculas solúveis (SAMUEL *et al.*, 2019). Os linfócitos são divididos em dois subtipos, Linfócitos B e Linfócitos T. Os Linfócitos B são precursores

das células formadoras de anticorpos, já os linfócitos T, participam das reações de hipersensibilidade tardia, e ambas estão presentes nas lesões periapicais (TORABINEJAD; KETTERING, 1985). Assim, elegemos para este estudo o marcador CD8 para a identificação de Linfócitos T citotóxicos e supressores, e o marcador CD20, para a identificação de Linfócitos B, determinando assim, parte da resposta inflamatória e seus mecanismos.

Após a redução do processo inflamatório, o processo de reparo se inicia com a diferenciação, migração e proliferação fibroblástica, seguida da deposição e posterior maturação do colágeno. O colágeno pode ser avaliado por meio da coloração de Picrosirius red (PSR), cuja birrefringência permite distinguir as fibras maduras de imaturas (BENETTI *et al.*, 2020). Assim, realizaremos a coloração de PSR e analisaremos sob luz polarizada para observar o grau de maturação colágena dos diferentes tipos e cimentos em função do stress por retenção.

Alguns tipos de cimentos podem induzir a biomineralização que pode ser avaliada pela técnica de von Kossa e por meio da luz polarizada (CINTRA *et al.*, 2017b). A coloração pela técnica de von Kossa é utilizada para detectar estruturas mineralizadas do tecido, que na análise microscópica aparecem coradas em preto. A observação em luz polarizada permite observar estruturas birrefringentes que possuem cristais de carbonato de cálcio originados a partir da combinação dos íons cálcio do material e o gás carbônico do tecido (GOMES-FILHO *et al.*, 2009). Ainda, proteínas indicadoras do processo de mineralização, como osteocalcina (OCN) está associada com o desencadeamento de deposição de cristais de cálcio, o que nos leva a visualizar um processo formador de tecido mineral sendo identificado nos locais onde grandes níveis desse marcador são encontrados (COSME-SILVA *et al.*, 2019a). A OCN é uma proteína não colagenosa encontrada em osso e dentina que participa no controle da biomineralização e homeostase de íons cálcio nos tecidos frente ao contato com materiais seladores e/ou indutores do processo mineralizador (COSME-SILVA *et al.*, 2019b). Assim, as análises de von Kossa, luz polarizada e imunomarcagem para OCN podem auxiliar a identificar o potencial biomineralizador dos diferentes tipos e cimentos em função do stress por retenção.

Com relação aos materiais, foram selecionados diferentes tipos de cimentos endodônticos. O cimento Sealapex foi selecionado pela capacidade de induzir a mineralização nos tecidos por possuir óxido de cálcio, que quando em contato com os fluidos tissulares, formam o hidróxido de cálcio, capaz de promover a mineralização de tecidos, além disso, é biocompatível e osteoindutor (BUENO *et al.*, 2016). A dissociação iônica do cálcio presente no hidróxido de cálcio e a dissociação do dióxido de carbono nos tecidos, formam os cristais de calcita, que irão promover a mineralização (HOLLAND *et al.*, 2002). O cimento AH Plus foi

selecionado por ser um dos cimentos mais utilizados no mundo, sendo considerado o padrão ouro pela literatura científica, pois possui excelentes propriedades físicas (CINTRA *et al.*, 2017b), além da biocompatibilidade (CINTRA *et al.*, 2017c; SILVA *et al.*, 2013). Apesar de se mostrar citotóxico em estudos *in vitro*, sua citotoxicidade é apontada nos períodos iniciais, sofrendo uma redução significativa com o passar do tempo (CINTRA *et al.*, 2017c). Após uma semana em contato com os tecidos já se apresenta um material biocompatível (MORGENTAL *et al.*, 2011). O cimento Endofill, um cimento a base de óxido de zinco e eugenol, foi selecionado por possuir uma resposta inflamatória mais exacerbada quando comparada aos outros cimentos, além de ser mais citotóxico, característica provavelmente desencadeada pela presença do eugenol em sua composição, mantendo um processo inflamatório significativo mesmo após períodos mais longos (CINTRA *et al.*, 2017c; MARTINS *et al.*, 2016; MORGENTAL *et al.*, 2011). Apesar de suas características inflamatórias negativas, esse cimento possui um grande histórico de uso e ainda vem sendo muito utilizado por cirurgiões-dentistas (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Os períodos de observação são fundamentais para o estudo de materiais de uso odontológico. De acordo com a FDI os períodos de observação para o estudo de cimentos endodônticos são: 7, 15, 30, 60 e 90 dias pós-operatórios (AMERICAN NATIONAL STANDARDS INSTITUTE, 1979; FEDERATION DENTAIRE INTERNATIONALE, 1980). No presente estudo optamos pelos períodos de 7 e 30 dias, pois o objetivo principal é investigar a influência do estresse sobre o processo inflamatório, e, para a maioria dos cimentos, é mais expressivo nos períodos iniciais.

Portanto, a proposta do presente estudo é a de correlacionar o estresse crônico com as respostas teciduais frente a diferentes tipos de cimentos endodônticos, aplicando metodologias já conhecidas e padronizadas.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a influência do estresse por retenção sobre a resposta tecidual dos cimentos endodônticos Sealapex, Endofill e AH Plus empregando o modelo ISO 10993-6:2016, para testes de implantação em tecido subcutâneo.

Objetivos específicos:

- Avaliar os níveis séricos de corticosterona no sangue de ratos estressados (rE) ou não (rC).
- Avaliar o infiltrado inflamatório frente aos diferentes cimentos, pela coloração de hematoxilina-eosina (HE), e pela marcação imunoistoquímica para os mediadores inflamatórios IL-6, IL-17 e TNF- α , assim como para células inflamatórias específicas por meio da marcação do CD8 e CD20, em tecido subcutâneo de rE e rC;
- Avaliar a produção e maturação do colágeno frente aos diferentes cimentos, por meio da coloração de Picrosirius red, em tecido subcutâneo de rE e rC;
- Avaliar a biomineralização frente aos diferentes cimentos, pela técnica de von Kossa, por meio da birrefringência à luz polarizada, e pela imunomarcação para OCN, em tecido subcutâneo de rE e rC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

- Animais

Foram utilizados 28 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), pesando entre 250g a 280g, com 75 dias de vida, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas, quatro ratos por gaiola, alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água “*ad libitum*”, exceto nas primeiras 24 horas após a intervenção. Os procedimentos experimentais propostos foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais – CEUA (Processo FOA nº 0250-2021).

- Drogas

Os animais ficaram em quarentena para adaptação no novo habitat e para contenção de alguma possível doença de fácil propagação. Uma semana antecedente ao procedimento cirúrgico, os animais foram vermifugados com Ivermectina 1% (Boehringer Ingelheim Animal Health do Brasil Ltda, Paulínia, Brasil) via oral (0,3 ml dissolvidos em 1 litro de água) por um período de 5 dias.

O protocolo anestésico utilizado para o procedimento cirúrgico de implantação dos tubos foi à base de Xilazina 2% (relaxante muscular, analgésico e sedativo, Xilazin, Syntec – Barueri, Brasil – 10mg/Kg) e à base de Cloridrato de Cetamina a 10% (Cetamin, Syntec – Barueri, Brasil – 80mg/Kg), via intramuscular. Para eutanásia, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com Thiopentax® 3% (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil), na dosagem de 150mg/kg e, em seguida, foram decapitados com o auxílio de uma guilhotina.

- Cimentos endodônticos utilizados

Foram utilizados o cimento Sealapex® (Kerr Endodontics, SybronEndo, Joinville, Brasil, Endofill® (DENTSPLY Indústria e Comércio Ltda. Pirassununga, Brasil) e AH Plus®

(DENTSPLY Indústria e Comércio Ltda. Pirassununga, Brasil) (Figura 1). Cada cimento foi preparado de acordo com a especificações do fabricante e imediatamente inseridos nos tubos de polietileno. As especificações de cada produto estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Nome comercial e composição dos cimentos endodônticos utilizados

<u>Nome/ Marca comercial</u>	<u>Composição</u>
<u>Sealapex</u> (Kerr Endodontics)	Catalisador: Salicilato de isobutila, trióxido de bismuto, dióxido de titânio, pigmentos. Pasta base: Óxido de zinco, resina polimérica, hidróxido de cálcio.
<u>Endofill</u> (Dentsply Sirona)	Pó: Óxido de Zinco, Resina Hidrogenada, Subcarbonato de Bismuto, Sulfato de Bário e Borato de Sódio. Líquido: Eugenol, Óleo de Amêndoas e BHT.
<u>AH Plus</u> (Dentsply Sirona)	Pasta A (cor âmbar): Bisphenol-A epoxy resin, Bisphenol-F epoxy resin, Tungstato de cálcio, Óxido de Zircônio, Sílica, Pigmentos de óxido de ferro. Pasta B (cor branca): Dibenzylidiamine, Aminoadamentane, Tricyclodecane-diamine, Tungstato de cálcio, Óxido de zircônio, Sílica, Óleo de silicone.

Fonte: Justo, 2022

Figura 1 - Cimentos endodônticos selecionados para o estudo (AH Plus®, Endofill® e Sealapex®)



Fonte: Justo, 2022

3.2 Métodos

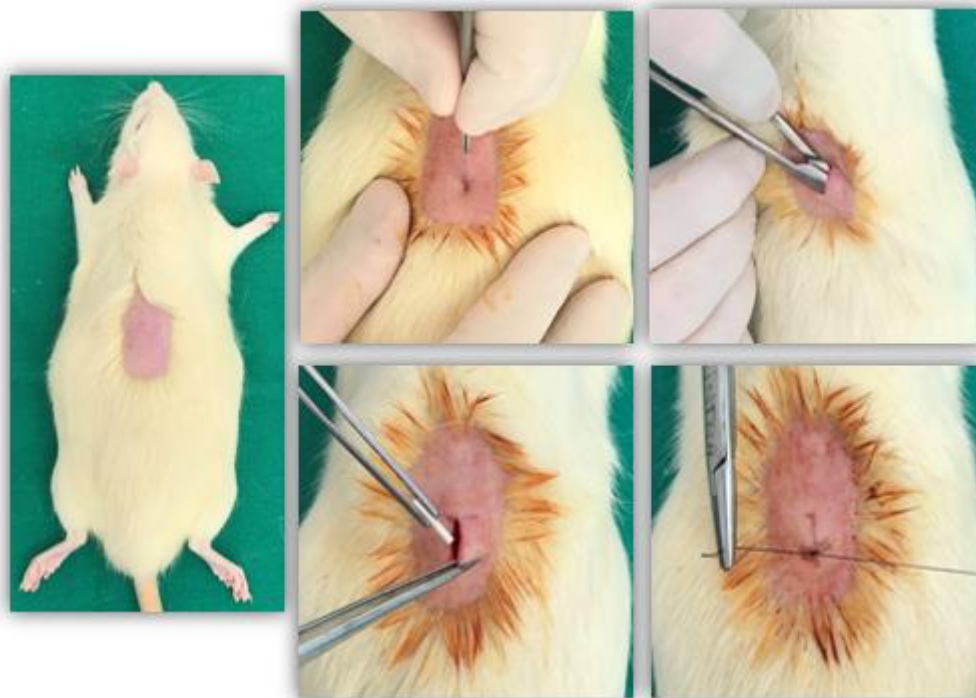
- Implantação dos tubos

Foram utilizados 112 tubos de polietileno (Abbot Lab. Do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) com 1,0 mm de diâmetro interno, 1,6 mm de diâmetro externo e 10,0 mm de comprimento (ISO 10993-6:2016) (International Organization for Standardization, 2016) os quais foram esterilizados em óxido de etileno (ISO 10993-7:2008) (International Organization for Standardization, 2008).

Os animais foram inicialmente pesados, e o protocolo anestésico descrito anteriormente foi utilizado. O período de trabalho com cada animal não ultrapassou 5 minutos e não houve necessidade de complementação anestésica.

Após a anestesia, foi feita a tricotomia da região dorsal e lavagem da área com a finalidade de se evitar contaminação do campo cirúrgico pela presença de pelos. A antissepsia da área desprovida de pelos foi efetuada com solução de iodo 5%. Em seguida, o procedimento cirúrgico iniciou-se, realizando uma incisão com lâmina de bisturi número 15 no dorso do animal (tendo a coluna vertebral como linha média de marcação). Após a divulsão do tecido subcutâneo para o lado esquerdo da porção cranial e caudal e direito da porção cranial e caudal, cada bolsa recebeu um tubo com auxílio de pinça reta. Assim, cada animal recebeu quatro tubos, sendo três preenchidos com um dos cimentos e um tubo vazio para controle. O tecido foi suturado com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson e Johnson, São Paulo, Brasil) não reabsorvível e antissepsia final foi realizada com solução de iodo 5% (Figura 2). Os animais foram acompanhados até se recuperarem da anestesia antes de retornarem ao biotério.

Figura 2 - Sequência operatória da implantação de tubos de polietileno na região dorsal do animal



Fonte: Justo, 2022

- Indução do estresse crônico por retenção

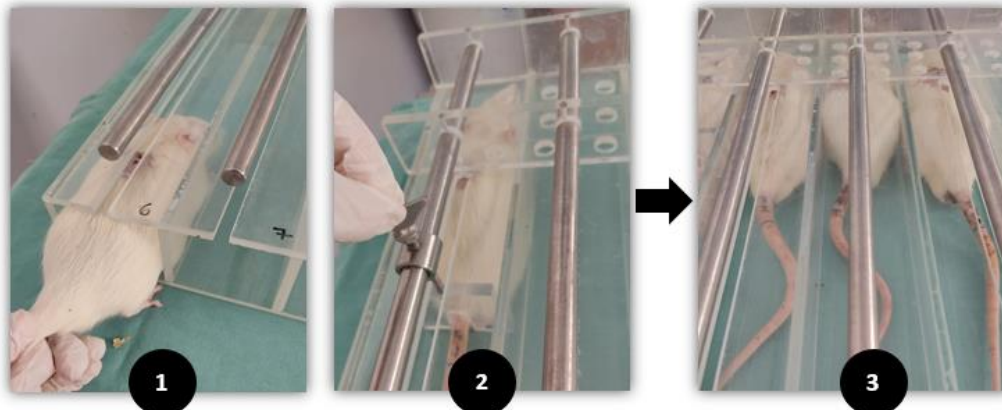
Para indução do estresse crônico foi utilizado o modelo de retenção física descrito na literatura (BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009; PARÉ; GLAVIN, 1986) com pequena modificação pois tínhamos aparelhos projetados e construídos especificamente para este fim. Os aparelhos foram construídos com material acrílico resistente e transparente composto cada um por 5 espaços retangulares individuais de largura fixa e comprimento ajustável com orifícios para ventilação. Cada espaço possui uma alavanca individual que quando colocada e ativada diminui a área de movimentação do animal para uma área próxima ao seu comprimento, determinando assim, a imobilização física (Figura 3). Para o estímulo estressor os animais foram colocados nas vagas individuais e as alavancas foram ajustadas para indução do estresse por contenção (Figura 4).

Figura 3 - Partes constituintes do aparelho para indução do estresse crônico

Fonte: Justo, 2022

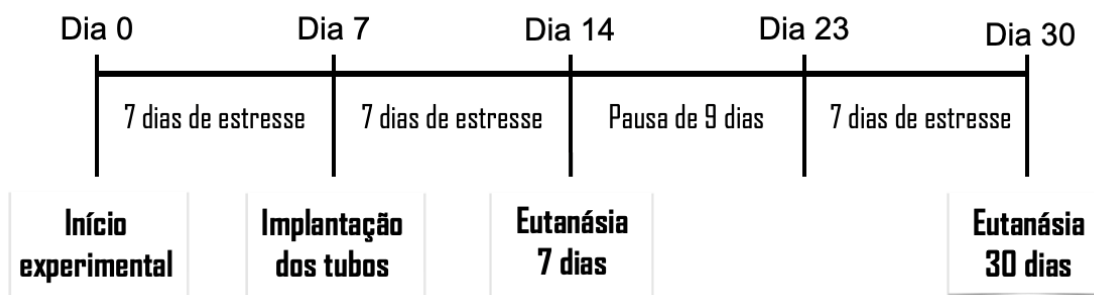
Os animais a serem submetidos ao estresse (rE), foram transportados da sala da colônia para uma sala tranquila e isolada. Os animais foram submetidos à retenção por 2 horas diárias das 8h às 10h. Empregamos o período de uma sessão de 2 horas que é considerado suficiente para ativar o eixo HPA e aumentar níveis circulantes de corticosterona (BUYNITSKY; MOSTOFISKY, 2009; ECHEVERRY; GUIMARÃES; DEL BEL, 2004). Com 7 dias de imobilização física, os animais já podem ser considerados estressados, com a ativação do eixo HPA, sendo que 14 dias é o máximo de tempo que esses animais podem ser estressados sem se habituar ao estímulo. No início do experimento, os animais foram submetidos ao estímulo estressor durante 7 dias, para que estivessem estressados no momento da implantação dos tubos. Os animais do primeiro período experimental passaram por 14 dias de indução do estresse para ativar o eixo HPA (7 dias antes e 7 dias depois da cirurgia de implantação dos tubos). Já os animais do segundo tempo experimental (30 dias), embora já sejam considerados animais estressados, passaram por um período de 9 dias sem imobilização física, e em seguida foram submetidos a mais 7 dias de estresse por retenção, até o momento da eutanásia. Esse cronograma foi adotado para evitar que os animais ficassem habituados com o estímulo estressor. Os animais do grupo controle (rC) foram mantidos em suas gaiolas sem serem perturbados, exceto no momento da pesagem.

Figura 4 - Manuseio dos animais e do aparelho. Em (1) animal é colocado no aparelho e ajuste da alavanca para manutenção do animal imobilizado em (2). Disposição final do animal em (3)



Fonte: Justo, 2022

O “timeline” do experimento pode ser observado abaixo:



- Grupos Experimentais

Os animais foram submetidos ao estresse de forma randomizada, ficando assim divididos em ratos controle (rC) e ratos estressados (rE). Como cada animal recebeu 4 implantes, sendo 3 com cimentos e 1 tubo vazio, ao final obtivemos 8 grupos apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Grupos experimentais conforme a presença do estresse e materiais teste

Condição sistêmica	Materiais teste			
	Controle/Vazio	Sealapex	AH Plus	Endofil
Ratos sem estresse – rC	Grupo Controle	Grupo Sealapex	Grupo AH Plus	Grupo Endofill
Ratos estressados - rE	Grupo Controle estressados	Grupo Sealapex estressados	Grupo AH Plus estressados	Grupo Endofill estressados

Fonte: Justo, 2022

- Eutanásia e coleta de amostra de sangue

Os períodos de avaliação foram de 7 e 30 dias. A cada tempo experimental, 7 animais foram eutanasiados. Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com Thiopentax® 3% (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil), na dosagem de 150mg/kg. Em seguida foi realizada a eutanásia com o auxílio de equipamento apropriado, a guilhotina, e o sangue foi coletado diretamente do tronco. As amostras de sangue foram transferidas para tubos contendo EDTA e centrifugadas a 800x g por 15 minutos, a 4°C. O plasma obtido foi armazenado a -80°C até o dia da análise da concentração plasmática de corticosterona.

- Dosagem do hormônio corticosterona pelo método ELISA

A concentrações de corticosterona presente no plasma foi mensurada por meio de ensaios enzimáticos (ELISA), utilizando kit comercial Elabscience Biotechnology Co. Ltd., USA (Figura 5) seguindo as recomendações do fabricante.

Figura 5 - Kit ELISA Elabscience

Fonte: Justo, 2022

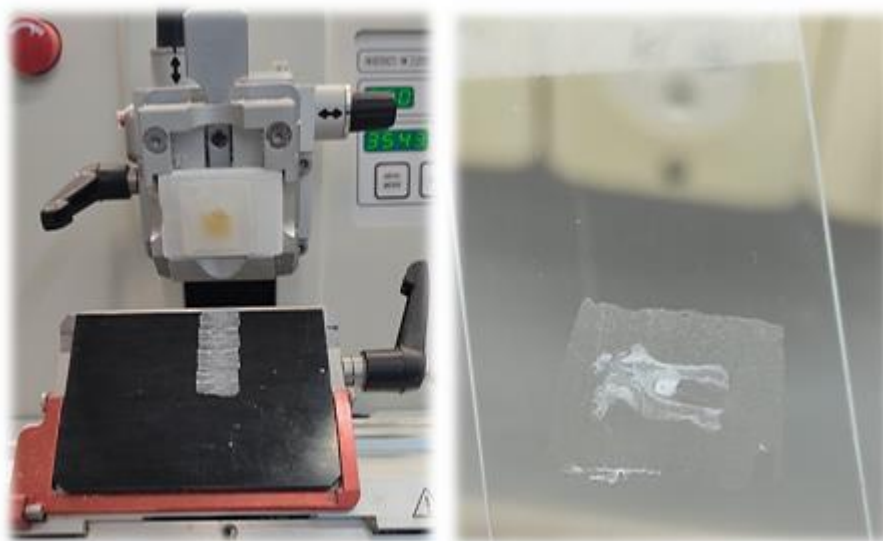
Os reagentes foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. Após a preparação, foram adicionados 50uL da amostra em cada poço. Imediatamente foram adicionados 50uL do reagente “*Biotinylated Detection Ab*” em cada poço e incubado por 45 min a 37°C. O conteúdo da placa foi aspirado e lavado com a solução “*Wash buffer*” por 3 vezes. Em seguida, foram adicionamos 100uL do “*HRP Conjugate*” em cada poço e incubado por 30 min a 37°C. O conteúdo da placa foi aspirado e lavado por mais 5 vezes. Foi adicionado 90uL do “*Substrate Reagent*” e incubado por 15 min a 37°C. Em seguida adicionamos 50uL da solução de parada “*Stop Solution*”. A leitura da reação colorimétrica foi realizada imediatamente a 450 nm em leitor de microplacas (EPOCHH, Bio Tek Instruments, Inc, Hinghland Park, Winooski, USA). A concentração plasmática analisada foi determinada a partir dos valores obtidos com a curva padrão realizada com as diferentes diluições da proteína recombinante.

- Coleta do tecido subcutâneo com os tubos de polietileno e processamento laboratorial

Após sacrifício, foi realizada novamente tricotomia da região dorsal e antisepsia da área com solução de iodo à 5%. Logo após, foi realizada nova incisão com lâmina de bisturi número 15 utilizando a coluna vertebral como linha média de marcação. Os tubos foram localizados e removidos juntamente com os tecidos circundantes e foram fixados em solução

formalina à 10% e pH 7. As amostras foram processadas, incluídas em parafina, cortadas seriadamente com 5µm de espessura e montadas em lâminas para as colorações de H.E., Picrosírios red e marcações imunohistoquímicas (Figura 6). Outros cortes de 10µm foram obtidos e as lâminas montadas para coloração pela técnica de von Kossa ou permanecerem sem coloração para serem observadas sob luz polarizada.

Figura 6 - Confeção dos cortes histológicos do tecido



Fonte: Justo, 2022

Para a técnica da imunohistoquímica, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em etanol. A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão Diva Decloaker® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada Decloaking Chamber® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Ao término de cada uma das etapas da reação imunohistoquímica foram efetuadas lavagens em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4. Os cortes histológicos foram imersos em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e em 1% de soro albumina bovino por 12 horas, para o bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas histológicas foram submetidas à incubação com seus respectivos anticorpos primários diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes foi empregado o Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA). As secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotinizado, durante 2 horas, e posteriormente tratadas com estreptavidina

conjugada com 12 a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Na revelação foi empregado como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA).

- Análise histológica e imunoistoquímica

Os resultados foram expostos por meio de análises descritiva, qualitativa e quantitativa, referentes a cada grupo experimental e tempo pós-operatório. As lâminas contendo os cortes mais representativos de cada espécime foram avaliadas sob a microscopia óptica e utilizadas na análise descritiva. A análise histomorfológica qualitativa consistiu na descrição dos fenômenos histopatológicos, procurando caracterizá-los globalmente em função das variáveis experimentais. As análises qualitativa e quantitativa foram realizadas seguindo os critérios previamente definidos:

- ***Critério infiltrado inflamatório***

Esta análise consistiu na avaliação das condições histopatológicas das estruturas examinadas, atribuindo magnitudes registradas sob a forma de escores de 1 a 4 para resposta inflamatória (FEDERATION DENTAIRE INTERNATIONAL, 1980), possibilitando dados para análise estatística no Software SigmaPlot 12.0™ (Chicago, IL, USA). A intensidade do processo inflamatório foi analisada em conformidade com o número médio de células inflamatórias presentes em diferentes campos, de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400X. O método de avaliação foi pela atribuição de escores e baseado nos critérios descritos por Orstavik (1988), Federation Dentaire International (1980) e Cintra *et al.* (2017c), assim considerados: Escore 1 - Células inflamatórias ausentes ou em número desprezível; Escore 2 - Infiltrado inflamatório discreto (menos de 25 células por campo); Escore 3 - Infiltrado inflamatório moderado (entre 25 e 125 células por campo); Escore 4 - Infiltrado inflamatório severo (mais que 125 células por campo).

- ***Critério fibrosamento (HE)***

O fibrosamento foi analisado por meio da mensuração da cápsula fibrosa. A cápsula foi considerada fina quando menor ou igual a 150 μ m e espessa quando maior que 150 μ m.

- ***Crêterios biomineraliza o (von Kossa, Luz polarizada e OCN)***

O potencial de biomineraliza o foi analisado pela presença ou ausência de marca o positiva para cálcio pela técnica de von Kossa, cujas estruturas são coradas em negro. Foram também utilizados cortes sem colora o, observados sob luz polarizada, para verifica o da birrefringência de granula es de calcita. A biomineraliza o também foi analisada pela presença de células OCN-positivas. As células imunomarcadas foram contadas em regiões próximas   abertura do tubo em aumentos de 400x e divididas pela área considerada, obtendo-se assim a densidade de células OCN⁺ por μ m².

- ***Cr terio matura o do Colágeno (PSR)***

Os níveis de matura o das fibras de colágeno foram analisados nas sec es coradas por PSR sob microscopia de luz polarizada. O programa Leica LAS 4.12 (Leica Microsystems, Nussloch – Germany) foi utilizado permitindo a sele o de cores correspondentes para cada tipo de fibra de colágeno nos tecidos subcutâneos. Após a sele o de cores, o programa calculou automaticamente a área referente   cada tipo de fibra. As fibras amarelas esverdeadas foram consideradas imaturas e finas, enquanto as fibras vermelhas amareladas foram consideradas maduras e grossas.

- ***Cr terio mediadores inflamator os (IL-6, IL-17 e TNF- )***

Os mediadores inflamator os foram analisados em conformidade com o número médio aproximado de marca es intracelular e matriz extracelular presentes em um mesmo espécime, examinados em aumento de 400X. Este número médio de células foi classificado nos seguintes escores (CINTRA *et al.*, 2016): Escore 1 - Ausência de imunocolora o na região de interesse; Escore 2 - Leve padrão de imunomarca o, cerca de 1/4 de células imunomarcadas e baixa marca o na matriz extracelular; Escore 3 - Moderado padrão de imunomarca o, cerca de 1/2 das células imunomarcadas e moderada marca o na matriz extracelular; Escore 4 –

Intenso padrão de imunomarcção, cerca de $\frac{3}{4}$ de células imunomarcadas e forte marcação na matriz extracelular.

- ***Marcadores celulares (CD8 e CD20)***

A quantificação microscópica dos linfócitos T citotóxicos/supressores e linfócitos B presentes nos espécimes examinados foram realizadas utilizando-se o Software Leica LAS 4.12 (Leica Microsystems, Nussloch – Germany). As células consideradas positivas foram aquelas que mostravam marcação completa da membrana citoplasmática, numa coloração acastanhada. As células imunomarcadas foram contadas em regiões próximas à abertura do tubo em aumentos de 400x e divididas pela área considerada, obtendo-se assim a densidade de células CD8⁺ e CD20⁺ por μm^2 .

- Análise Estatística

A avaliação microscópica foi efetuada por 1 observador cego e calibrado. A análise estatística foi realizada por meio do programa SigmaPlot 12.0™ (Chicago, IL, USA). A verificação da distribuição normal das variáveis contínuas quantitativas foi feita pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. As variáveis que apresentarem distribuição normal foram expressas em média e +- desvio padrão e aquelas que apresentarem distribuição não normal foram expressas em mediana com valor mínimo e máximo e percentis. Os valores quantitativos das análises que seguiram uma distribuição normal foram aplicados o teste ANOVA, enquanto que para comparações múltiplas dos resultados entre os grupos estudados, foi realizado o teste Tukey.

Para as análises em escores e para os valores quantitativos das análises que não seguirão uma distribuição normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, e quando observada alguma diferença significativa, foi realizado o cruzamento entre os grupos, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Também foi empregado o teste de Mann Whitney (SIEGEL *et al.*, 1956) para comparação entre dois grupos isoladamente. Para todos os testes empregados foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Concentração de Corticosterona

A análise do nível de corticosterona presente no plasma foi realizada e os achados podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3 - Média e desvio padrão (média \pm SD) para valores da concentração de corticosterona em rC e rE nos períodos experimentais de 7 e 30 dias

Animais	Nível de corticosterona (média \pm DP)	
	7 dias	30 dias
Ratos sem estresse – rC	7,36 \pm 2,10 ^a	8,56 \pm 2,88 ^a
Ratos estressados - rE	12,73 \pm 4,63 ^b	10,94 \pm 3,32 ^a

*Letras iguais nas colunas indicam a ausência de diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$).

Fonte: Justo, 2022

Observou-se que rE no período de 7 dias apresentaram aumento da concentração plasmática de corticosterona quando comparados à rC do mesmo período com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,021$). No período experimental de 30 dias pode-se observar discreto aumento em rE comparado a rC, mas sem diferença significativa entre si ($p = 0,148$).

4.2 Peso dos Animais

O peso dos animais pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4 - Média do ganho percentual de peso e desvio padrão (média \pm SD) em rC e rE nos períodos experimentais de 7 e 30 dias

Animais	Ganho de peso percentual (média \pm DP)	
	7 dias	30 dias
Ratos sem estresse - rC	28,55 \pm 5,08 ^a	66,13 \pm 7,35 ^a
Ratos estressados - rE	18,26 \pm 4,71 ^b	50,83 \pm 6,58 ^b

*Letras iguais nas colunas indicam a ausência de diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$).

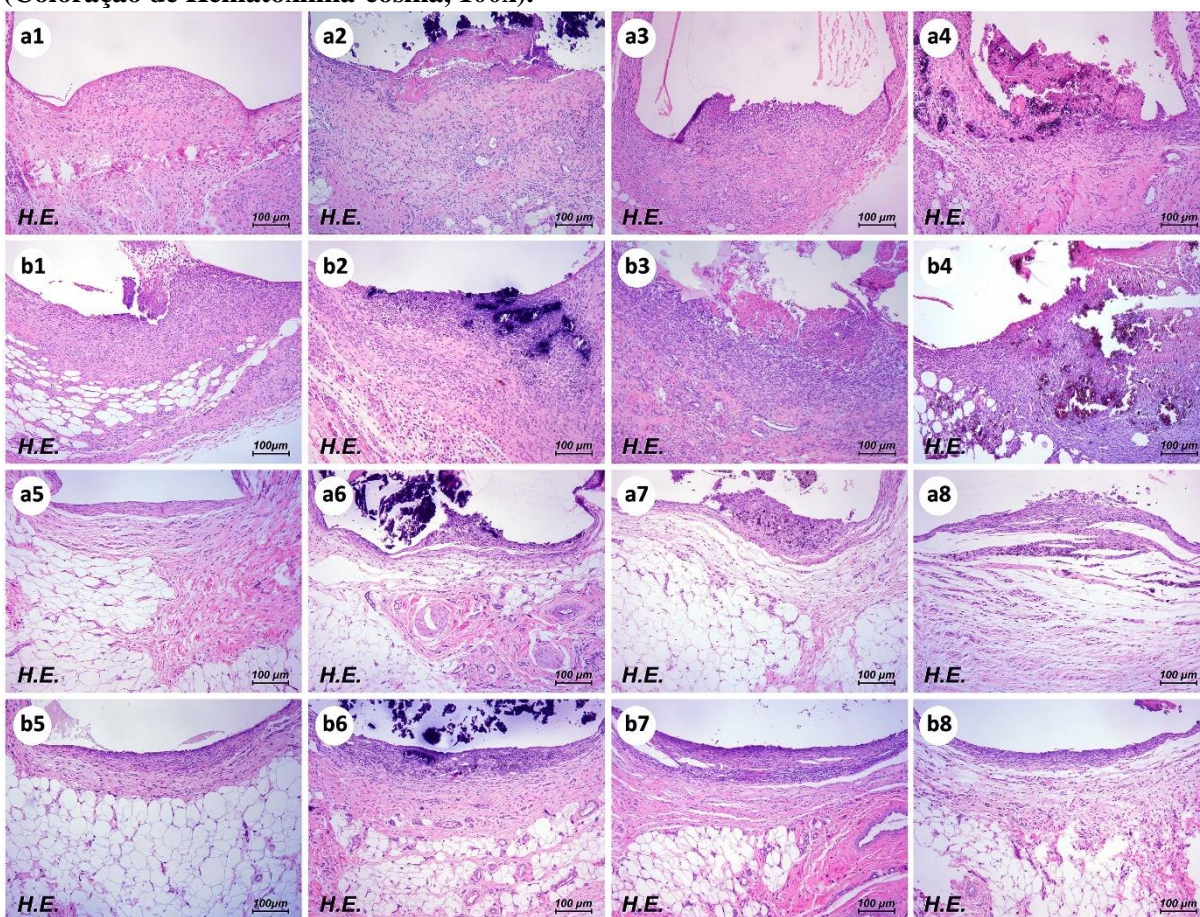
Fonte: Justo, 2022

Aos 7 e 30 dias observou-se que rC apresentaram percentual de ganho de peso corporal mais elevado quando comparado à rE, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,002$; $p = 0,001$).

4.3 Perfil Inflamatório (HE e Citocinas IL-6, IL-17 E TNF- α)

As imagens representativas dos diferentes espécimes de todos os grupos são mostradas na figura 7.

Figura 7. Imagens representativas das reações do tecido subcutâneo para rC (a1-a8) e rE (b1-b8) para cada tipo de cimento e grupo controle aos 7 dias (a1-a4; b1-4) e 30 dias (a5-a8 a b5-b8). (a1, b1, a5, b5 - Controle; a2, b2, a6, b6 - Sealapex; a3, b3, a7, b7 – Endofill; a4, b4, a8, b8 – AH Plus). (Coloração de Hematoxilina-eosina, 100x).



Grupos Controle

Aos 7 dias, o grupo Controle em rC apresentou intensidade da reação inflamatória mais branda e o tecido foi caracterizado pela presença de células crônicas, fibroblastos e sangue vasos, bem como a ausência de células gigantes e cápsulas fibrosas. Aos 30 dias foi possível observar tecido mais organizado com predominância de fibras conjuntivas, fibroblastos e ausência de áreas necróticas e células gigantes. Em rE aos 7 dias, o grupo Controle apresentou reação inflamatória moderada. O tecido foi infiltrado com células crônicas e poucos neutrófilos. Aos 30 dias foi possível observar tecido mais organizado com predominância de fibras conjuntivas, fibroblastos e ausência de áreas necróticas e células gigantes.

Grupo Sealapex

Aos 7 dias, tanto em rC quando em rE, observou-se reação inflamatória moderada composta principalmente de linfócitos e macrófagos na cápsula fibrosa espessa. Aos 30 dias, tanto em rC quando em rE, a intensidade da inflamação foi reduzida e considerada discreta.

Grupo Endofill

Aos 7 dias, tanto em rC quando em rE, observou-se reação inflamatória intensa, com um infiltrado linfoplasmático abundante e grande quantidade de macrófagos. Em algumas amostras, eosinófilos, neutrófilos, células gigantes e formação de abscesso puderam ser observados. A condensação fibrosa era irrelevante ou inexistente após 7 dias e se tornou mais evidente, embora não muito espessa ou desorganizada, após 30 dias.

Grupo AH Plus

Aos 7 dias, em rC quando em rE, observou-se reação inflamatória moderada. O tecido foi infiltrado com neutrófilos e macrófagos. Aos 30 dias, foi possível observar tecido mais organizado com predominância de fibras conectivas, fibroblastos e ausência de áreas necróticas e células gigantes. Uma cápsula fibrosa estava presente, embora não completamente formada.

Comparação entre os grupos

Na comparação entre os grupos em rC aos 7 dias, foi observado que o grupo Endofill apresentou infiltrado inflamatório mais intenso em comparação ao grupo Controle ($p = 0,031$). Aos 30 dias não houve diferença entre os grupos ($p = 0,662$). Em rE, não houve diferença entre os grupos aos 7 ($p = 0,692$) nem aos 30 dias ($p = 0,124$). Comparando a resposta de cada grupo em função da presença ou não do estresse, observou-se que aos 7 dias o grupo Controle em rE apresentou infiltrado inflamatório mais intenso que o grupo Controle em rC ($p = 0,038$). No período de 30 dias não houve diferença em nenhuma das comparações.

Os escores atribuídos para cada um dos parâmetros analisados estão apresentados na tabela 5.

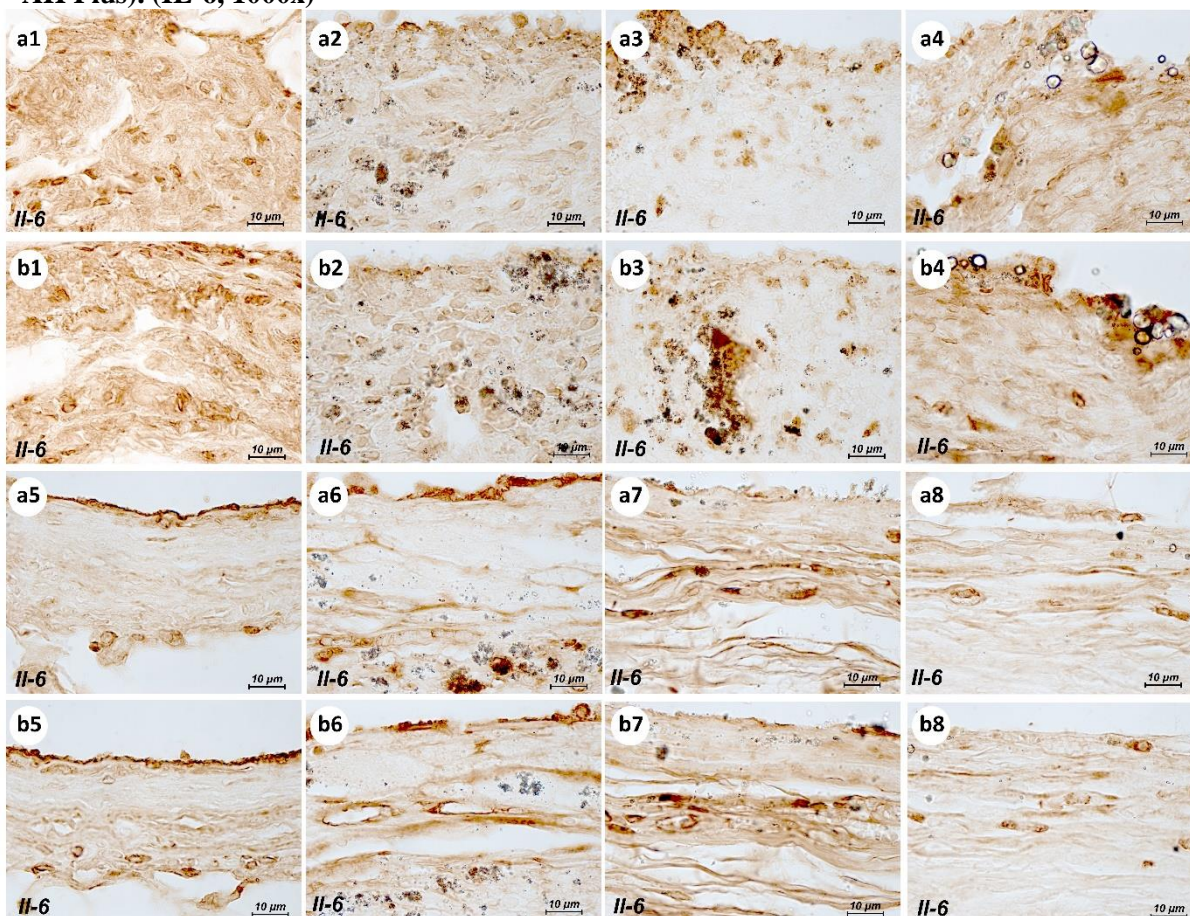
Tabela 5 - Escores medianos e interquartis atribuídos para a resposta inflamatória dos grupos Controle e de cimentos endodônticos em rC e rE

Período e critérios de análise		Grupos (escores medianos e interquartis)							
		Controle	Controle + estresse	Sealapex	Sealapex + estresse	Endofill	Endofill + estresse	AH Plus	AH Plus + estresse
7 dias	HE*	2(2-3) ^{Aa}	4(2-4) ^{Ab}	3(2-4) ^{ABa}	3(2-4) ^{Aa}	4(3-4) ^{Ba}	4(3-4) ^{Aa}	3(2-4) ^{ABa}	3(3-4) ^{Aa}
	IL-6*	3(3-4) ^{Aa}	4(3-4) ^{Aa}	3(3-4) ^{Aa}	3(3-4) ^{Aa}	4(3-4) ^{Aa}	4(3-4) ^{Aa}	3(3-4) ^{Aa}	4(3-4) ^{Aa}
	IL-17*	3(2-3) ^{Aa}	3(3-4) ^{Aa}	3(3-4) ^{ABa}	3(3-4) ^{Aa}	4(3-4) ^{Ba}	4(3-4) ^{Aa}	3(3-4) ^{ABa}	4(3-4) ^{Aa}
	TNF- α *	3(2-3) ^{Aa}	3(3-4) ^{Ab}	3(2-4) ^{Aa}	3(2-4) ^{Aa}	3(3-4) ^{Aa}	4(3-4) ^{Aa}	3(2-3) ^{Aa}	3(2-4) ^{Aa}
30 dias	HE*	1(1-2) ^{Aa}	2(1-2) ^{Aa}	2(1-3) ^{Aa}	2(1-4) ^{Aa}	2(1-3) ^{Aa}	3(2-4) ^{Aa}	2(1-3) ^{Aa}	2(1-3) ^{Aa}
	IL-6*	3(2-4) ^{Aa}	3(2-4) ^{Aa}	3(2-4) ^{Aa}	3(3-4) ^{Aa}	3(3-4) ^{Aa}	3(3-4) ^{Aa}	3(2-3) ^{Aa}	3(2-4) ^{Aa}
	IL-17*	3(2-3) ^{Aa}	3(2-3) ^{Aa}	3(2-3) ^{Aa}	3(3-4) ^{Aa}	3(3-4) ^{Aa}	3(3-4) ^{Aa}	3(2-3) ^{Aa}	3(3-4) ^{Aa}
	TNF- α *	3(2-3) ^{Aa}	3(2-4) ^{Aa}	3(2-4) ^{Aa}	3(2-4) ^{Aa}	3(3-4) ^{Aa}	3(3-4) ^{Aa}	3(2-3) ^{Aa}	3(2-3) ^{Aa}

*Letras maiúsculas iguais representam ausência de diferença estatística na análise entre os grupos em rC ou rE em cada tempo. Letras minúsculas iguais representam ausência de diferença estatística na análise entre dois grupos em função do estresse em cada tempo. (Controle versus Controle + estresse; Sealapex versus Sealapex + estresse; Endofill versus Endofill + estresse; AH Plus versus AH Plus + estresse).

As imagens representativas dos diferentes espécimes de todos os grupos são mostradas nas figuras de 8 a 10.

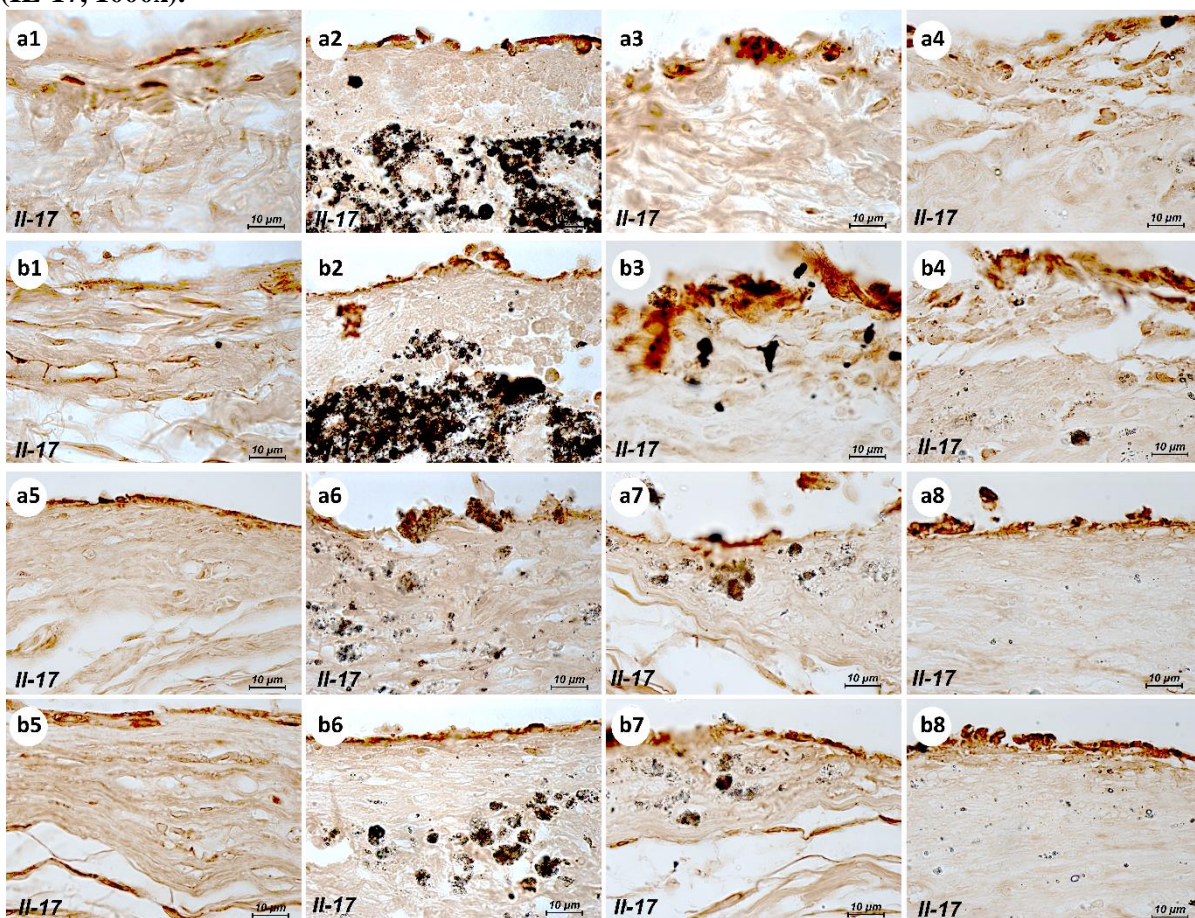
Figura 8 - Imagens representativas das reações do tecido subcutâneo para rC (a1-a8) e rE (b1-b8) para cada tipo de cimento e grupo controle aos 7 dias (a1-a4; b1-4) e 30 dias (a5-a8 a b5-b8). (a1, b1, a5, b5 - Controle; a2, b2, a6, b6 - Sealapex; a3, b3, a7, b7 – Endofill; a4, b4, a8, b8 – AH Plus). (IL-6, 1000x)



Fonte: Justo, 2022

Para IL-6, tanto em rC quanto em rE, aos 7 e 30 dias, não foram observadas diferenças estatísticas. Comparando a resposta de cada grupo em função da presença ou não do estresse, também não houve diferença em nenhuma das comparações e em nenhum período.

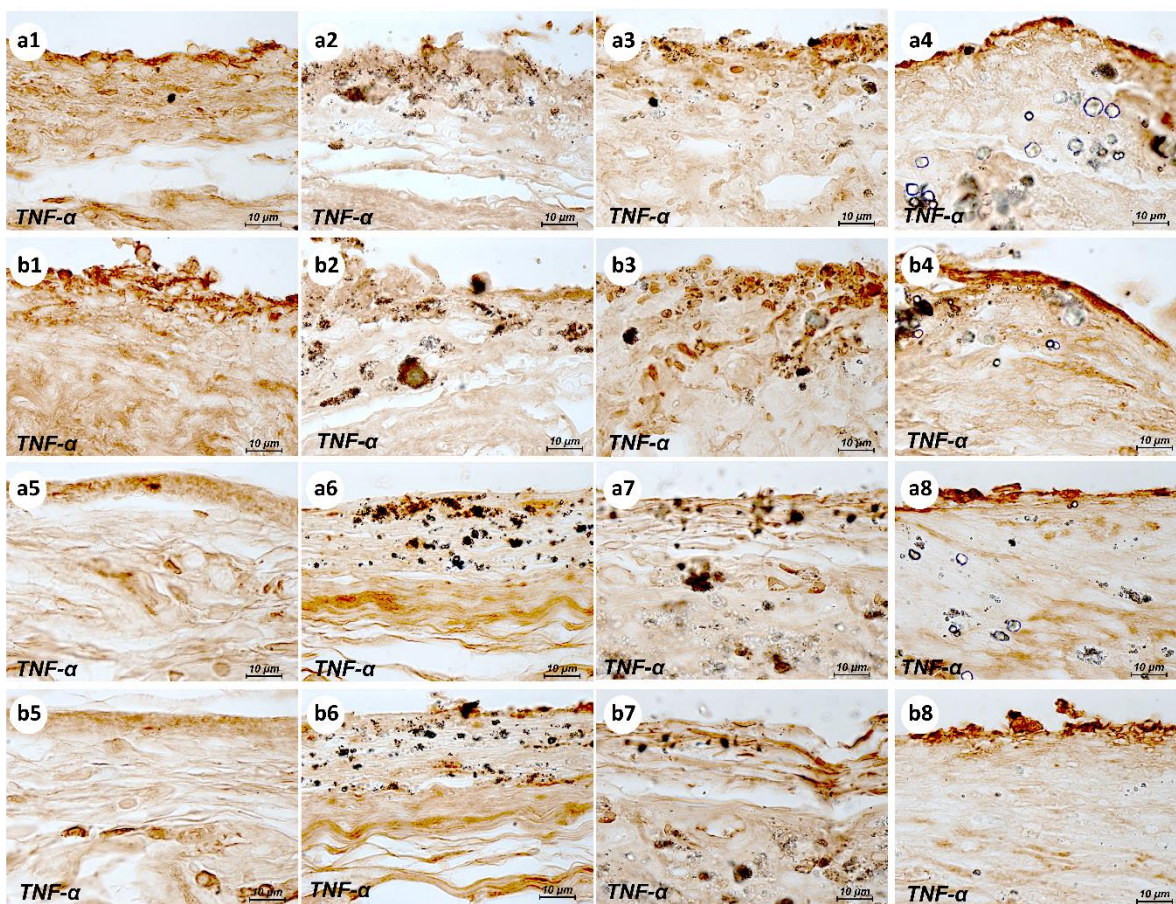
Figura 9 - Imagens representativas das reações do tecido subcutâneo para rC (a1-a8) e rE (b1-b8) para cada tipo de cimento e grupo controle aos 7 dias (a1-a4; b1-4) e 30 dias (a5-a8 a b5-b8). (a1, b1, a5, b5 - Controle; a2, b2, a6, b6 - Sealapex; a3, b3, a7, b7 – Endofill; a4, b4, a8, b8 – AH Plus). (IL-17, 1000x).



Fonte: Justo, 2022

Para IL-17, em rC, aos 7 dias, o grupo Endofill apresentou infiltrado inflamatório mais intenso quando comparado ao grupo Controle ($p = 0,010$). Aos 30 dias não houve diferença entre os grupos ($p = 0,073$). Em rE, não houve diferença entre os grupos aos 7 ($p = 0,337$) nem aos 30 dias ($p = 0,133$). Comparando a resposta de cada grupo em função da presença ou não do estresse, não houve diferença em nenhuma das comparações e em nenhum período.

Figura 10 - Imagens representativas das reações do tecido subcutâneo para rC (a1-a8) e rE (b1-b8) para cada tipo de cimento e grupo controle aos 7 dias (a1-a4; b1-4) e 30 dias (a5-a8 a b5-b8). (a1, b1, a5, b5 - Controle; a2, b2, a6, b6 - Sealapex; a3, b3, a7, b7 – Endofill; a4, b4, a8, b8 – AH Plus). (TNF- α , 1000x)



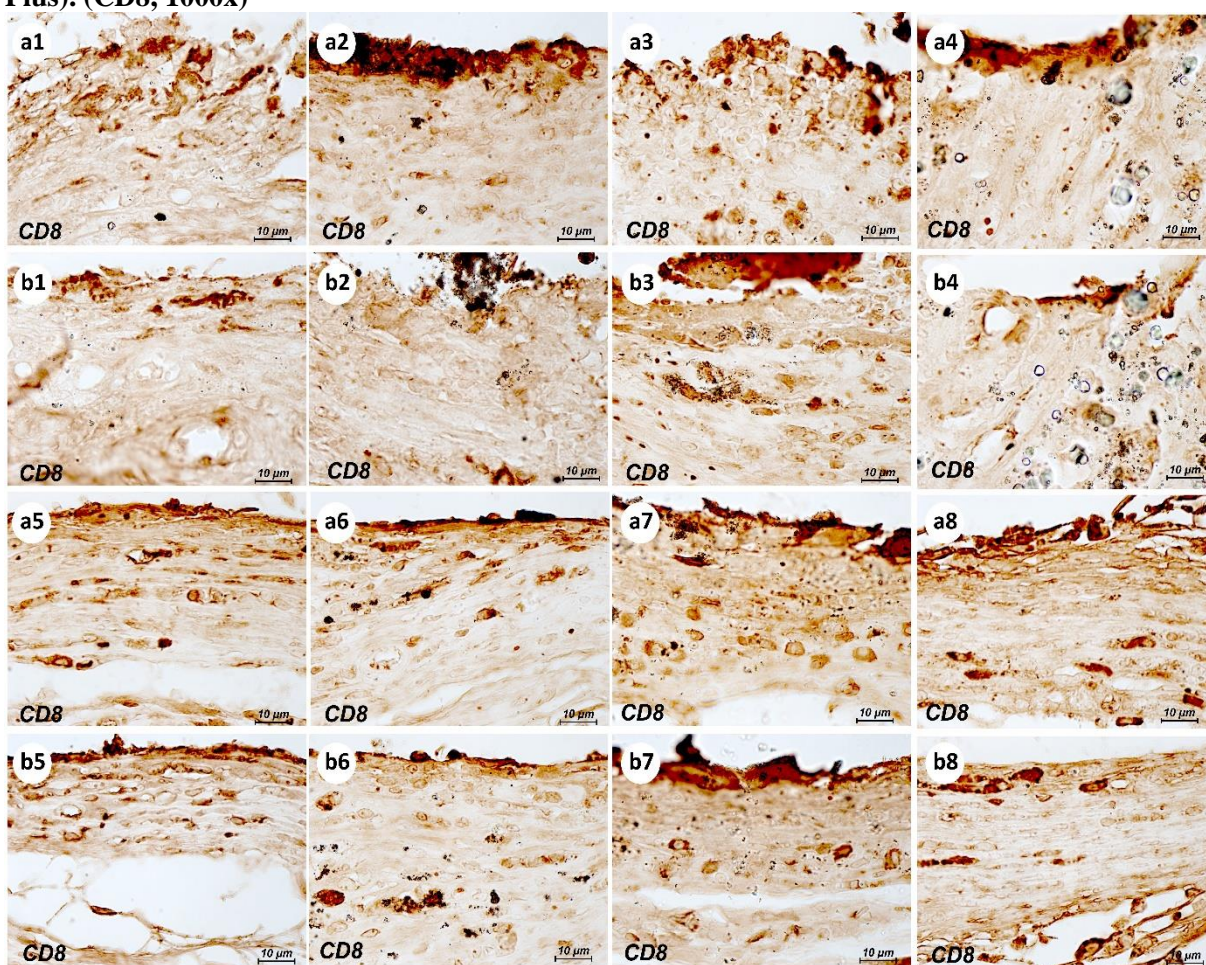
Fonte: Justo, 2022

Para TNF- α , em rC, aos 7 e 30 dias, não foram observadas diferenças estatísticas, assim como na comparação entre os grupos em rE nos 2 períodos. Comparando a resposta de cada grupo em função da presença ou não do estresse, observou-se que aos 7 dias o grupo Controle em rE apresentou maior imunomarcção para TNF- α que o grupo controle em rC ($p = 0,049$). No período de 30 dias não houve diferença em nenhuma das comparações.

4.4 CD8 e CD20

As imagens representativas dos diferentes espécimes de todos os grupos são mostradas na Figura 11 e 12.

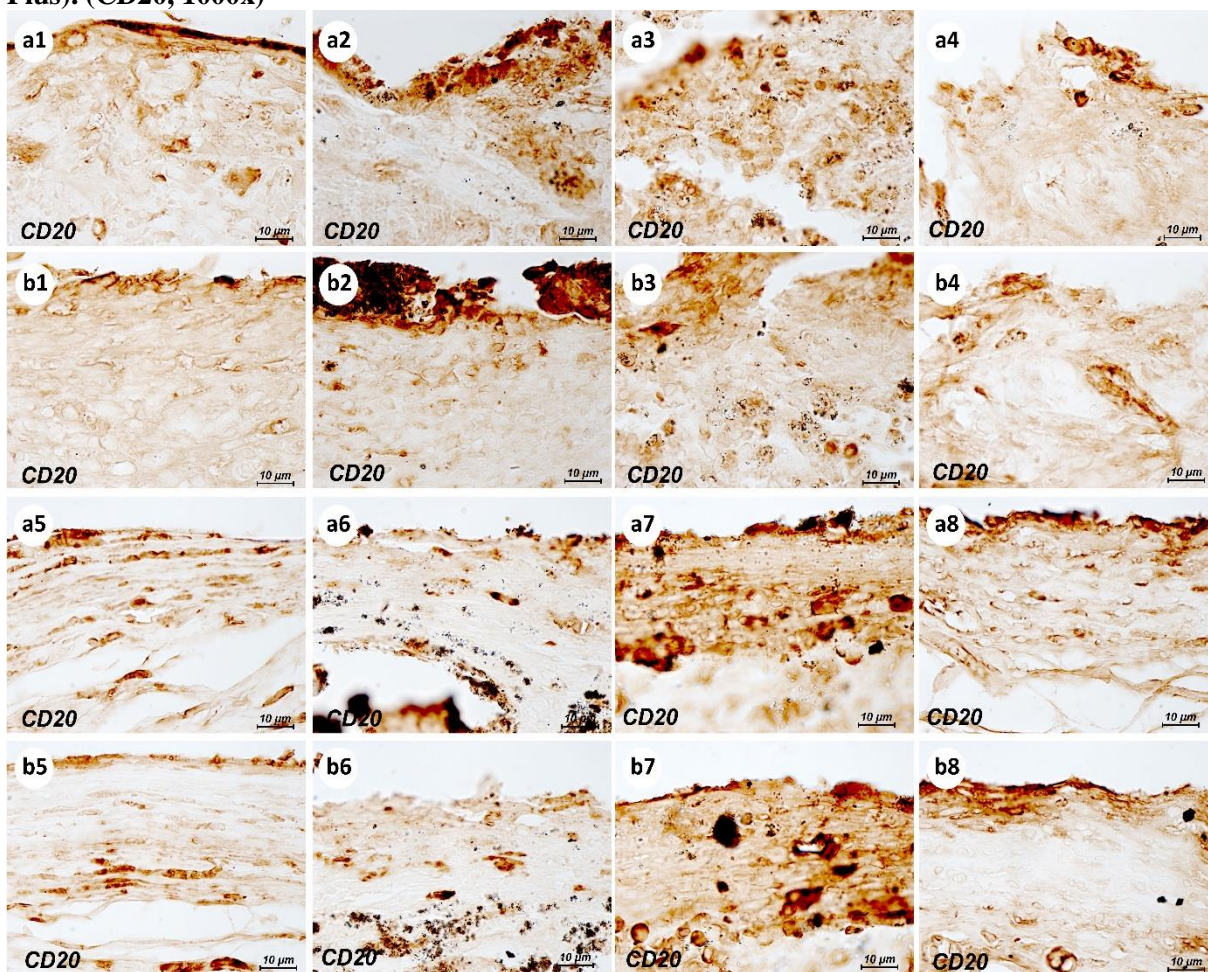
Figura 11 - Imagens representativas das reações do tecido subcutâneo para rC (a1-a8) e rE (b1-b8) para cada tipo de cimento e grupo controle aos 7 dias (a1-a4; b1-4) e 30 dias (a5-a8 a b5-b8). (a1, b1, a5, b5 - Controle; a2, b2, a6, b6 - Sealapex; a3, b3, a7, b7 – Endofill; a4, b4, a8, b8 – AH Plus). (CD8, 1000x)



Fonte: Justo, 2022

Para CD8, em rC, aos 7 e 30 dias, não foram observadas diferenças estatísticas, assim como na comparação em rE nos 2 períodos. Comparando a resposta de cada grupo em função da presença ou não do estresse, no período de 7 dias não houve diferença em nenhuma das comparações. Já aos 30 dias, observou-se que o grupo AH Plus em rC apresentou maior quantidade de células CD8+ comparado ao grupo AH Plus em rE ($p = 0,002$).

Figura 12 - Imagens representativas das reações do tecido subcutâneo para rC (a1-a8) e rE (b1-b8) para cada tipo de cimento e grupo controle aos 7 dias (a1-a4; b1-4) e 30 dias (a5-a8 a b5-b8). (a1, b1, a5, b5 - Controle; a2, b2, a6, b6 - Sealapex; a3, b3, a7, b7 – Endofill; a4, b4, a8, b8 – AH Plus). (CD20, 1000x)



Fonte: Justo, 2022

Para CD20, em rC, aos 7 dias, foi observado que o grupo Endofill apresentou maior quantidade de células CD20+ quando comparado aos grupos Controle e Sealapex ($p = 0,025$). Aos 30 dias não houve diferença entre os grupos ($p = 0,064$). Em rE, aos 7 dias, foi observado que o grupo Endofill apresentou maior quantidade de células CD20+ quando comparado ao grupo Controle ($p = 0,009$). Não houve diferença entre os grupos aos 30 dias ($p = 0,106$). Comparando a resposta de cada grupo em função da presença ou não do estresse, observou-se que aos 7 dias o grupo Controle em rC apresentou maior quantidade de células CD20+ comparado ao grupo Controle em rE ($p = 0,045$). No período de 30 dias não houve diferença em nenhuma das comparações.

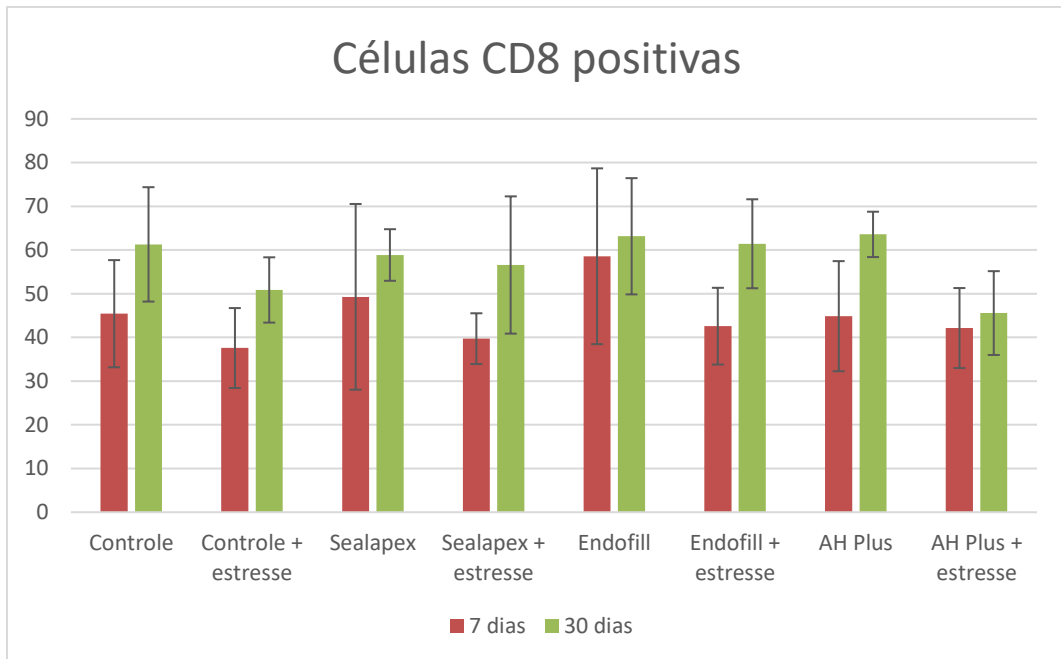
A densidade de células imunomarcadas para um dos marcadores celulares está apresentada na tabela 6 e representadas nos gráficos de barras.

Tabela 6 - Média da imunorreatividade para CD8 e CD20 em rC e rE nos períodos de 7 e 30 dias

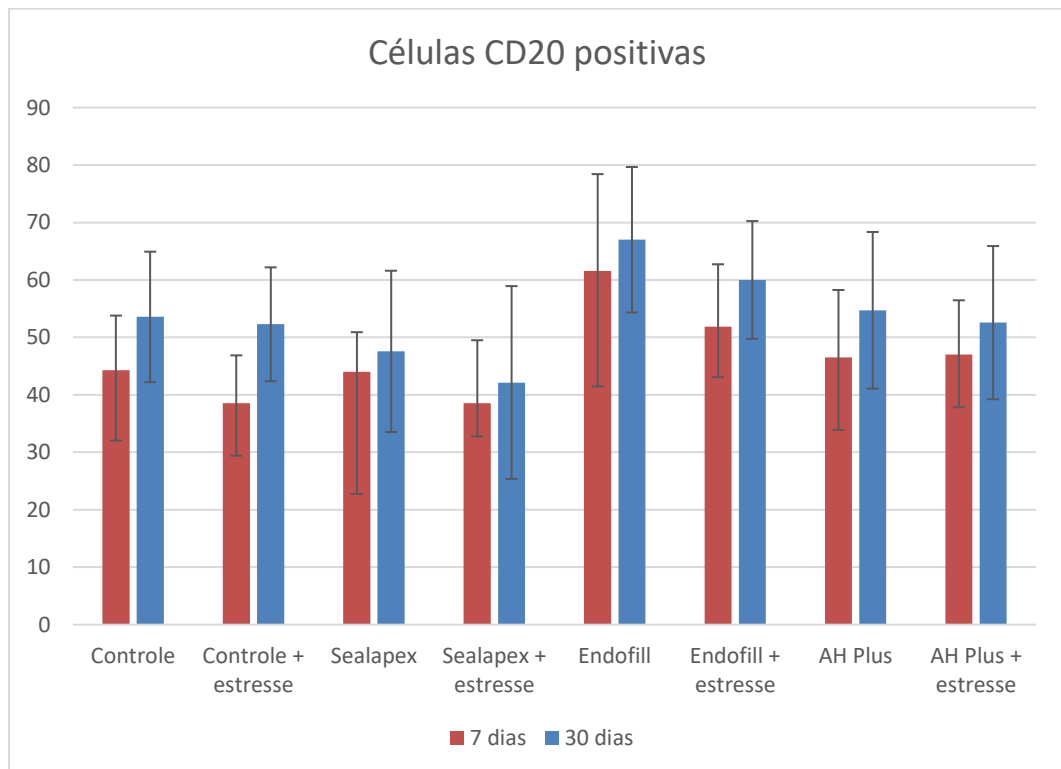
Tempos	Grupos	Média \pm SD	
		CD8	CD20
7 dias	Controle	45,43 \pm 12,26 ^{Aa}	44,29 \pm 9,52 ^{Aa}
	Controle + estresse	37,57 \pm 9,14 ^{Aa}	34,29 \pm 6,82 ^{Ab}
	Sealapex	49,29 \pm 21,01 ^{Aa}	44,00 \pm 6,32 ^{Aa}
	Sealapex + estresse	39,71 \pm 6,55 ^{Aa}	38,57 \pm 10,94 ^{ABa}
	Endofill	58,57 \pm 20,65 ^{Aa}	61,57 \pm 15,46 ^{Ba}
	Endofill + estresse	42,57 \pm 8,38 ^{Aa}	51,86 \pm 10,29 ^{Ba}
	AH Plus	44,86 \pm 14,26 ^{Aa}	46,50 \pm 12,76 ^{ABa}
	AH Plus + estresse	42,14 \pm 8,55 ^{Aa}	47,00 \pm 9,70 ^{ABa}
30 dias	Controle	61,29 \pm 13,09 ^{Aa}	53,57 \pm 11,36 ^{Aa}
	Controle + estresse	50,86 \pm 7,47 ^{Aa}	52,29 \pm 9,91 ^{Aa}
	Sealapex	58,86 \pm 5,90 ^{Aa}	47,57 \pm 14,03 ^{Aa}
	Sealapex + estresse	56,57 \pm 15,70 ^{Aa}	42,14 \pm 16,79 ^{Aa}
	Endofill	63,14 \pm 13,30 ^{Aa}	67,00 \pm 12,66 ^{Aa}
	Endofill + estresse	61,43 \pm 10,18 ^{Aa}	60,00 \pm 10,25 ^{Aa}
	AH Plus	63,57 \pm 5,19 ^{Aa}	54,71 \pm 13,63 ^{Aa}
	AH Plus + estresse	45,57 \pm 9,59 ^{Ab}	52,57 \pm 13,33 ^{Aa}

*Letras maiúsculas iguais representam ausência de diferença estatística na análise entre os grupos em rC ou rE em cada tempo. Letras minúsculas iguais representam ausência de diferença estatística na análise entre dois grupos em função do estresse em cada tempo (Controle versus Controle + estresse; Sealapex versus Sealapex + estresse; Endofill versus Endofill + estresse; AH Plus versus AH Plus + estresse).

Justo, 2022

Gráfico 1 - Células CD8 POSITIVAS em rC e em rE

Fonte: Justo, 2022

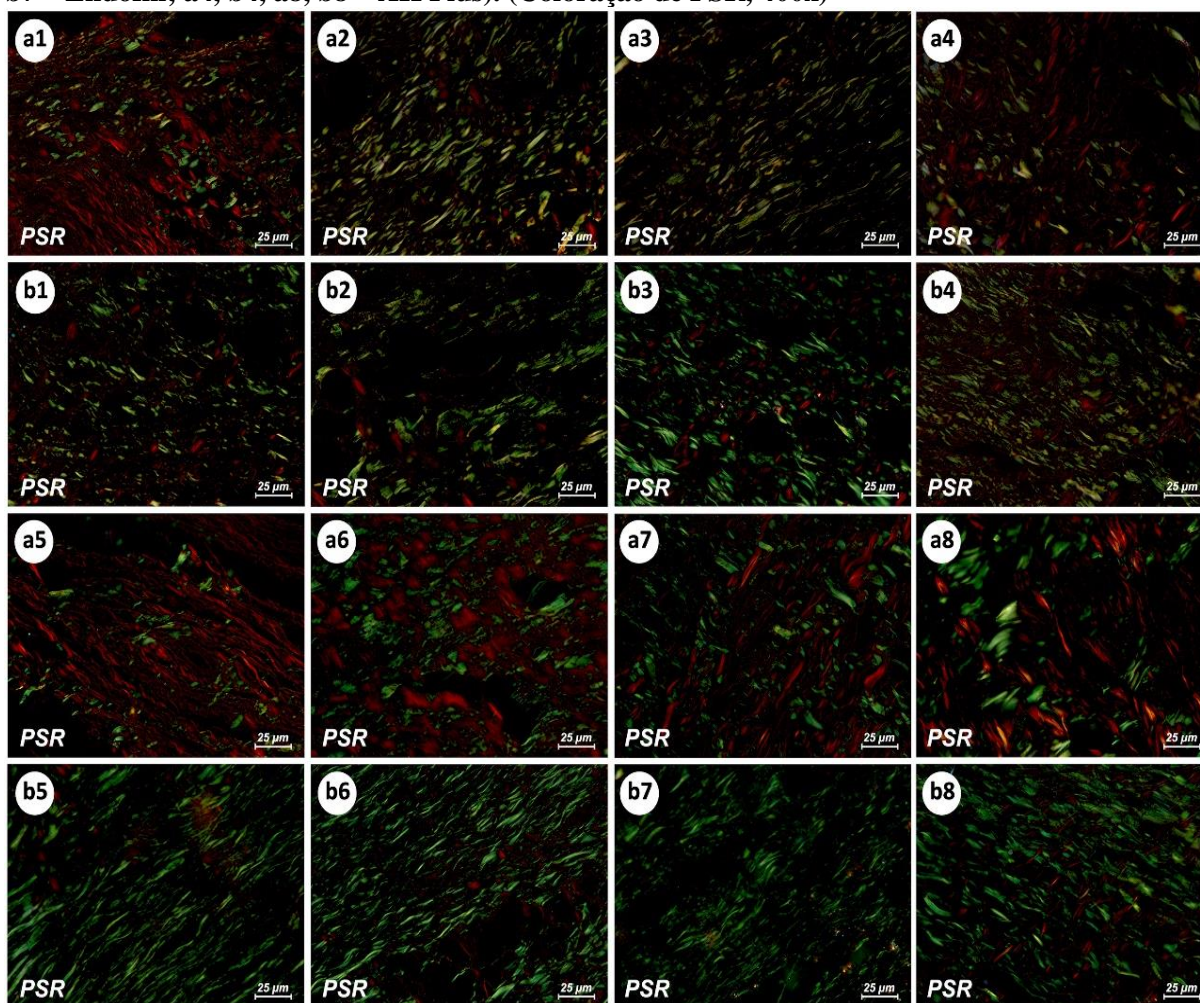
Gráfico 2 - Células CD20 POSITIVAS em rC e em rE

Fonte: Justo, 2022

4.5 Maturação do Colágeno

As imagens representativas dos diferentes espécimes de todos os grupos são mostradas na Figura 13. Os escores atribuídos para cada um dos parâmetros analisados estão apresentados na tabela 7.

Figura 13 - Imagens representativas da coloração de PSR para identificar a maturação de fibras colágenas em rC (a1-a8) e rE (b1-b8) para cada tipo de cimento e grupo controle aos 7 dias (a1-a4; b1-4) e 30 dias (a5-a8 a b5-b8). (a1, b1, a5, b5 - Controle; a2, b2, a6, b6 - Sealapex; a3, b3, a7, b7 - Endofill; a4, b4, a8, b8 - AH Plus). (Coloração de PSR, 400x)



Fonte: Justo, 2022

Tabela 7 - Média das fibras maduras e imaturas de cimentos endodônticos em rC e rE

Tempos	Grupos	Maturação Colágena (%)	
		Fibras imaturas	Fibras maduras
7 dias	Controle	41.97 ^{Aa}	58.03 ^{Aa}
	Controle + estresse	59.83 ^{Aa}	40.17 ^{Aa}
	Sealapex	68.72 ^{Ba}	31.28 ^{Ba}
	Sealapex + estresse	66.56 ^{Aa}	33.44 ^{Aa}
	Endofill	74.58 ^{Ba}	25.42 ^{Ba}
	Endofill + estresse	65.94 ^{Aa}	34.06 ^{Aa}
	AH Plus	44.10 ^{Aa}	55.90 ^{Aa}
	AH Plus + estresse	58.27 ^{Ab}	41.73 ^{Ab}
30 dias	Controle	35.60 ^{Aa}	64.40 ^{Aa}
	Controle + estresse	73.12 ^{Ab}	26.88 ^{Ab}
	Sealapex	31.78 ^{Aa}	68.22 ^{Aa}
	Sealapex + estresse	81.92 ^{Ab}	18.08 ^{Ab}
	Endofill	42.84 ^{Aa}	57.16 ^{Aa}
	Endofill + estresse	85.47 ^{Ab}	14.53 ^{Ab}
	AH Plus	43.29 ^{Aa}	56.71 ^{Aa}
	AH Plus + estresse	86.36 ^{Ab}	13.64 ^{Ab}

*Letras maiúsculas iguais representam ausência de diferença estatística na análise entre os grupos em rC ou rE em cada tempo. Letras minúsculas iguais representam ausência de diferença estatística na análise entre dois grupos em função do estresse em cada tempo (Controle versus Controle + estresse; Sealapex versus Sealapex + estresse; Endofill versus Endofill + estresse; AH Plus versus AH Plus + estresse).

Fonte: Justo, 2022

Em rC, aos 7 dias, os grupos Sealapex e Endofill apresentaram maior percentual de fibras imaturas e menor percentual de fibras maduras quando comparados aos grupos Controle e AH Plus ($p < 0,001$). No período de 30 dias, em rC não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos para nenhum tipo de fibra ($p = 0,222$). Em rE, aos 7 dias ($p = 0,487$) e aos 30 dias ($p = 0,198$), não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, tanto para fibras imaturas quanto para fibras maduras.

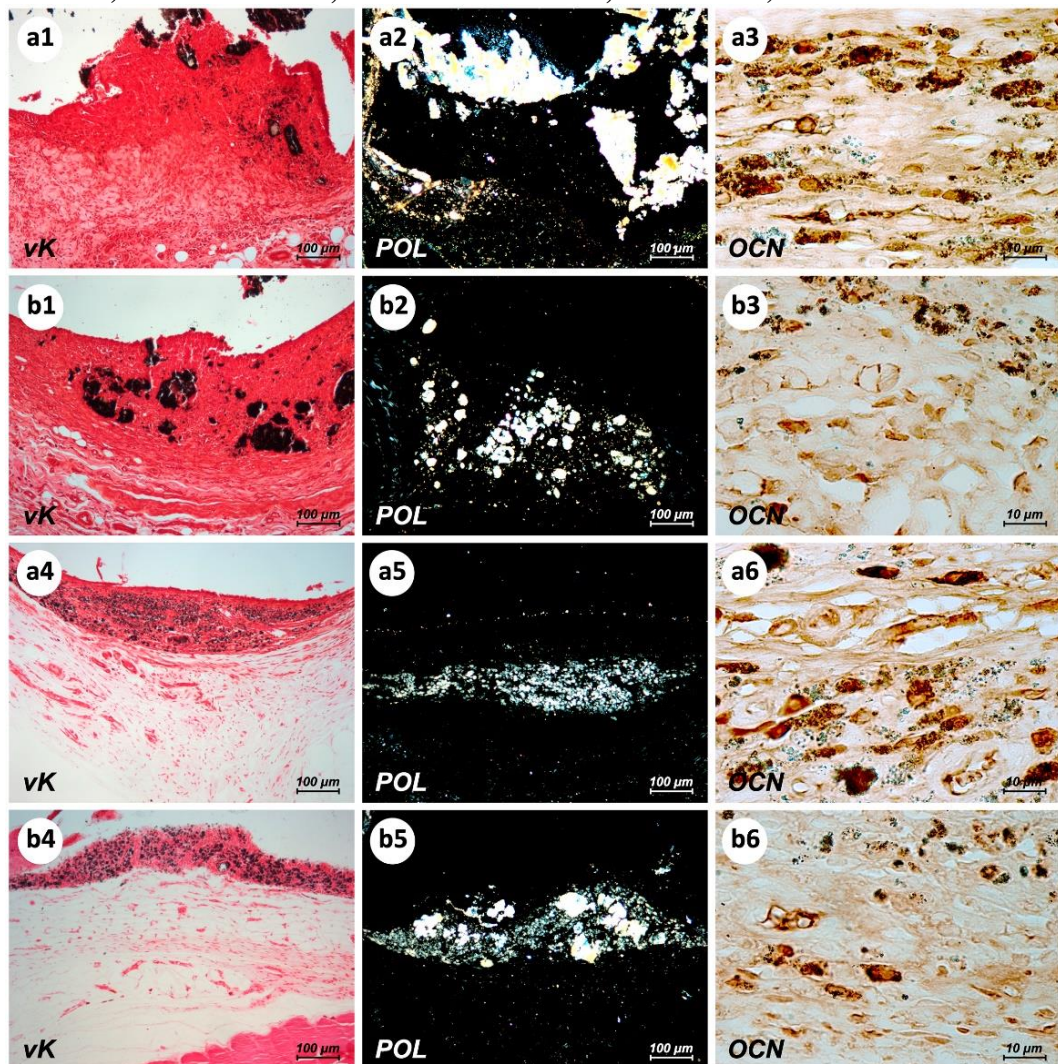
Comparando cada grupo em função do estresse, observamos que o grupo Controle em rE não apresentou diferença para o grupo Controle em rC aos 7 dias ($p = 0,152$), para nenhum tipo de fibra. Já aos 30 dias, o grupo Controle em rE apresentou maior percentual de fibras imaturas e menor percentual de fibras maduras comparado ao grupo Controle em rC ($p =$

0,027). O grupo Sealapex em rE não apresentou diferença para o grupo Sealapex em rC aos 7 dias ($p = 0,656$), para nenhum tipo de fibra. Já aos 30 dias, o grupo Sealapex em rE apresentou maior percentual de fibras imaturas e menor percentual de fibras maduras comparado ao grupo Sealapex em rC ($p < 0,001$). O grupo Endofill em rE não apresentou diferença para o grupo Endofill sem estresse aos 7 dias ($p = 0,420$), para nenhum tipo de fibra. Já aos 30 dias, o grupo Endofill em rE apresentou maior percentual de fibras imaturas e menor percentual de fibras maduras comparado ao grupo Endofill em rC ($p < 0,001$). O grupo AH Plus em rE, tanto aos 7 dias ($p < 0,027$), quando aos 30 dias ($p < 0,001$) apresentou maior percentual de fibras imaturas e menor percentual de fibras maduras comparado ao grupo AH Plus em rC

4.6 Biomineralização – vK, POL and OCN

Imagens representativas para técnica de von Kossa, cortes sem coloração sob luz polarizada e imunomarcção para OCN são mostradas nas Figura 14.

Figura 14 - Imagens representativas de von Kossa (à esquerda), luz polarizada (ao centro) e OCN (à direita) em rC (a1-a6) e rE (b1-b6) para o cimento Sealapex em 7 dias (a1-a3; b1-b3) e 30 dias (a4-a6 a b4-b6). von Kossa 100x; Luz Polarizada 100x; OCN 1000x)



Fonte: Justo, 2022

As análises atribuídas para cada um dos parâmetros analisados estão apresentadas na tabela 8 e no gráfico de barras.

Tabela 8 - Média da capacidade de mineralização de cimentos endodônticos em rC e rE

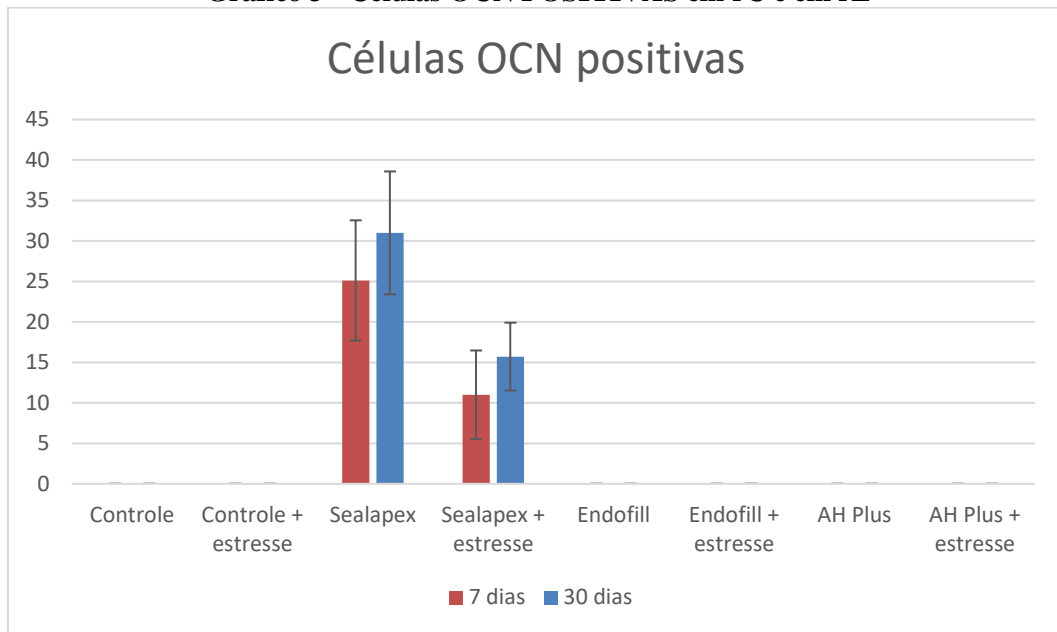
Tempos	Grupos	Critério Biomineralização (%)		
		VK	POL	OCN
7 dias	Controle	0	0	0
	Controle + estresse	0	0	0
	Sealapex	100	100	25,1 ^a
	Sealapex + estresse	100	100	11 ^b
	Endofill	0	0	0
	Endofill + estresse	0	0	0
	AH Plus	0	0	0
	AH Plus + estresse	0	0	0
30 dias	Controle	0	0	0
	Controle + estresse	0	0	0
	Sealapex	100	100	31 ^a
	Sealapex + estresse	100	100	15,7 ^b
	Endofill	0	0	0
	Endofill + estresse	0	0	0
	AH Plus	0	0	0
	AH Plus + estresse	0	0	0

* Letras minúsculas iguais representam ausência de diferença estatística na análise entre dois grupos em função do estresse em cada tempo (Sealapex versus Sealapex + estresse).

Fonte: Justo, 2022

Foi possível identificar a deposição de cálcio em todos os períodos apenas para o grupo Sealapex independente da presença ou não do estresse. Na coloração von Kossa foi observado estruturas coradas em negro indicando a presença do carbonato de cálcio. Nas lâminas sem coloração observadas sob luz polarizada foram encontrados cristais birrefringentes indicando a presença de cálcio junto a abertura do tubo. Estas estruturas não foram observadas nos grupos Controle, Endofill e AH Plus.

A imunomarcagem para OCN foi observada em todos os espécimes do grupo Sealapex. Já para os grupos Controle, Endofill e AH Plus não foram encontradas marcações positivas para OCN. Comparando a resposta do grupo Sealapex em função da presença ou não do estresse, observou-se aos 7 dias ($p = 0,002$) e 30 dias ($p = 0,001$) que em rE houve menor quantidade de células OCN⁺ comparado a rC.

Gráfico 3 - Células OCN POSITIVAS em rC e em rE

Fonte: Justo, 2022

5 DISCUSSÃO

Esse estudo buscou investigar a resposta tecidual de cimentos endodônticos já conhecidos na literatura e estudados pelo nosso grupo de pesquisa e sua relação com o organismo estressado cronicamente. O modelo animal para testes de biocompatibilidade empregado é amplamente usado para avaliar a resposta de materiais odontológicos, incluindo materiais obturadores do canal radicular. Este modelo é regulado pela norma ISO 10993-6 (International Organization for Standardization, 2016) e fornece provas rápidas e válidas para as respostas biológicas de um determinado material.

Para a indução do estresse crônico utilizamos aparelho próprio para indução do estresse, consistindo em um aparelho de acrílico com compartimentos e regulagens para manter o animal devidamente imobilizado. Esse modelo tem sido muito utilizado em estudos de estresse agudo e crônico, principalmente por sua facilidade de acesso e por tornar possível a exposição de um número relativamente grande de ratos ao estresse (MATALLAH; GUEZI; BAIRI, 2022). Os critérios fisiológicos são importantes para afirmar o estado de estresse dos animais. No presente estudo avaliamos tanto o peso corporal como o nível de corticosterona no sangue dos animais para verificar e confirmar a presença do estresse.

Como descrito nos resultados, ao final dos dois períodos, os animais estressados demonstraram redução do peso corporal quando comparados aos grupos sem estresse. Esses resultados estão de acordo com achados da literatura onde, o estresse por restrição repetida, promove redução do peso corporal que é mantido durante onze semanas após o final da aplicação do estresse (HARRIS *et al.*, 2006). Alguns estudos já haviam demonstrado que ratos submetidos ao estresse crônico pesaram menos que o grupo controle desde o primeiro dia até o final do experimento (TAMASHIRO *et al.*, 2007; KIM; HAN, 2006). Em 2022, Mattalah, Guezi e Bairi observaram que após 14 dias de experimento, ratos do grupo estressado tiveram diminuição significativa do peso corporal em comparação com ratos do grupo de controle. Estas conclusões estão de acordo com Willner *et al.* (1997) e corroboram com outras descobertas na literatura, que sugerem que a perda de peso corporal induzida pelo estresse pode ser uma consequência do aumento da atividade do eixo HPA (HARRIS *et al.*, 1998; KRAEMER; CHU; CASTRACANE, 2002; LEVIN *et al.*, 2000; SMAGIN *et al.*, 1999). Em caso de estresse prolongado, o efeito catabólico e a gliconeogênese, estimulados pelos glicocorticosteróides, têm como consequência a perda de peso dos animais, pois os tecidos muscular e gorduroso são transformados em glicose, para fins de produção de energia (ENCARNAÇÃO, 1986)

Quanto à dosagem do hormônio corticosterona, observou-se que os animais do grupo estressado no período de 7 dias apresentaram aumento da concentração plasmática de corticosterona quando comparamos com o grupo sem estresse do mesmo período. No grupo com estresse no tempo experimental de 30 dias pode-se observar um pequeno aumento do nível de corticosterona, mas sem diferença estatística significativa. Isso pode ter ocorrido devido ao longo período de exposição ao estresse, mesmo adotando um intervalo de 9 dias, os animais podem ter sido capazes de se habituar ao estímulo estressor no segundo período de observação.

A literatura é muito heterogênea para essa metodologia e os estudos convergem para o uso de vários minutos a várias horas, sendo na maioria dos casos de 2 e 6 horas por dia durante várias semanas, normalmente 1 a 3 semanas (BUYNITSKY; MOSTOFISKY, 2009; PARÉ; GLAVIN, 1986). O estudo de Kim e Han (2006) demonstrou que a restrição por 2 a 8 horas diárias durante 14 dias poderia ser usado como um modelo viável para o estudo da ansiedade, depressão e funções relacionadas ao estresse. Por outro lado, no estudo de Macedo (2010), ao final de seis semanas de exposição a estresse repetido, não foi observado aumento nos níveis séricos de corticosterona, corroborando com estudos prévios (CAMPEAU *et al.*, 2002; CHROUSOS, 2007; TORRES *et al.*, 2001) e sugerindo habituação do eixo HPA. Estudos utilizando diferentes protocolos de estresse repetido por seis semanas, demonstram habituação ao estresse e níveis de corticosterona similares aos animais controle e como discussão propõem mecanismos adaptativos e compensatórios deste hormônio, como fator de proteção da homeostase (SASSE *et al.*, 2008; SHIN *et al.*, 2010; TORRES *et al.*, 2001). Os eixos HPA e Simpático-adrenal parecem estar envolvidos na adaptação ao estresse (MANSI; DROLET, 1997; OSTRANDER *et al.*, 2006). O aumento na retroalimentação negativa dos glicocorticoides, diminuição da secreção hipotalâmica de CRH, exaustão da capacidade secretória de corticotrofos e diminuição de receptores da hipófise para reguladores de ACTH, são alguns mecanismos envolvidos nesta adaptação (HAUGER *et al.*, 1988).

Embora os animais aos 30 dias não tenham apresentado um nível muito elevado de corticosterona, sabemos que passaram por estresse, visto que aos 7 dias os níveis desse hormônio estavam aumentados. A questão central do trabalho é compreender melhor a resposta tecidual dos cimentos em organismo estressado. Assim, pelo fato de terem passado pelo estresse, os resultados aos 30 dias também sofreram influência no curso do processo reparativo dos tecidos em função dos cimentos implantados ou do tubo vazio no grupo controle.

Nosso grupo de pesquisa investiga intensamente a resposta tecidual frente aos cimentos endodônticos (BENETTI *et al.*, 2019; BUENO *et al.*, 2016; CINTRA *et al.*, 2017a).

Portanto, para esse estudo escolhemos utilizar três tipos de cimentos, que diferem em sua composição, para que pudéssemos observar a reação de cada um em organismo alterado sistemicamente.

Histologicamente, na comparação entre os grupos em animais não estressados aos 7 dias, foi observado que o grupo Endofill apresentou infiltrado inflamatório mais intenso em comparação ao grupo controle. Estes resultados podem ser explicados pela presença do eugenol, que é responsável por sua forte ação antimicrobiana, mas é um componente muito irritante para os tecidos (CINTRA *et al.*, 2017b; ZMENER *et al.*, 2012). Os cimentos Sealapex e AH Plus provocaram uma resposta inflamatória diferente do grupo controle, porém menor que a do grupo Endofill, sem diferença estatisticamente significativa. Isso pode ser explicado pela ação do hidróxido de cálcio que tem efeitos importantes sobre os tecidos, promovendo pH alcalino, tendo efeito antibacteriano e acelerando o processo de reparação de tecidos (DUARTE; DEMARCHI; MORAES, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Nos estudos de Cintra *et al.* (2017a) vimos que, aos 7 dias, o AH Plus promoveu uma reação inflamatória moderada que foi reduzida ao longo do tempo sendo após 1 semana, considerado biocompatível.

Quando comparamos a resposta dos grupos em função da presença ou não do estresse, ainda em 7 dias, o grupo controle sem estresse apresentou menor infiltrado inflamatório do que o grupo controle com estresse. Muitos estudos mostram que o estresse por restrição foi capaz de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, o que exacerba a resposta inflamatória do tecido (KIM *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2018; MOGRABI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020). A resposta inflamatória aos cimentos aos 7 dias se mostra mais intensa, e neste estudo, não foi possível observar diferença entre a resposta inflamatória pela coloração de H.E. dos grupos com cimento em um organismo estressado ou não.

Aprofundamos mais nossas análises, realizando as colorações de imunohistoquímica para observar a presença das citocinas nos tecidos, o que pode nos explicar a resposta inflamatória.

Pesquisas desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa têm mostrado que a IL-6 é aumentada na presença de cimentos endodônticos (COSME-SILVA *et al.*, 2019a, 2020; SILVA *et al.*, 2015). Os resultados observados no estudo de Oliveira *et al.* (2022), também sugeriram um aumento da IL-6 e TNF- α em resposta aos cimentos sendo regulada pela suplementação sistêmica do omega-3. A IL-6 teve uma maior expressão no grupo Endofill e nos grupos com estresse, embora não tenha sido estatisticamente diferente. Já o TNF- α no grupo controle sem

estresse estava mais baixo do que no grupo controle estressado, indo de encontro com o achado na coloração de H.E. Estudo de Wang *et al.* (2020), mostrou que as citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α aumentaram na presença do estresse. Além disso, foi documentado que as elevadas citocinas pró-inflamatórias podem promover a ativação do eixo HPA enquanto que, a atividade do eixo HPA exerce uma regulação consistente sobre a inflamação periférica (ZHANG; LI; PENG, 2010; IOB; KIRSCHBAUM; STEPTOE, 2020), demonstrando a via bidirecional entre estresse e inflamação. Liu *et al.* (2018) e Kim *et al.* (2016) também mostraram um aumento dessas citocinas na presença do estresse.

O cimento Endofill que tem uma resposta muito exacerbada, teve uma maior expressão de IL-17. A IL-17 desempenha um papel crucial na imunidade inata, pois sua secreção desencadeia a produção de numerosas quimiocinas, resultando no recrutamento de neutrófilos e macrófagos e posterior depuração de patógenos (KRAMER; GAFFEN, 2007). O estresse excessivo induz níveis elevados de glicocorticóides, que podem causar inflamação através de células Th17 que secretam IL-17 (HASHMI; ZENG, 2006) e atua em tipos diferentes de células, fazendo-as secretar citocinas, como IL-6 e também sinergetiza potentemente com TNF- α , aumentando sua atividade (SHIMBA; IKUTA, 2020a).

Neste estudo, a imunomarcção das citocinas foi feita localmente, que era o alvo do nosso estudo. E apenas no grupo controle observamos a influência do estresse na coloração de H.E e imunomarcção para TNF- α . Talvez o estresse não tenha influenciado localmente de forma muito consistente na expressão das citocinas, embora sistemicamente o organismo esteja estressado. Ou talvez presença dos cimentos já tenha por sí só estimulado certa quantidade de citocina e a presença do estresse não foi capaz de alterá-las de forma significativa.

Os linfócitos são responsáveis pelo reconhecimento imune específico dos patógenos e pelo desenvolvimento das respostas imunes adaptativas. Estas células se originam na medula óssea, sendo os linfócitos T diferenciados no timo e participantes da imunidade mediada por células e, os linfócitos B, na medula óssea e produtores de anticorpos (imunidade humoral) (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; ROITT; BRUSTOFF; MALE, 1999).

Nesse estudo podemos observar um efeito supressor de linfócitos nos animais estressados, embora não tenha sido diferente estatisticamente. Aos 30 dias conseguimos notar que o grupo AH Plus não estressado apresentou maior quantidade de células CD8⁺ comparado ao grupo AH Plus estressado. No artigo de revisão de Taves e Ashwell (2021) a atuação dos glicocorticóides são bem discutidos, apontando os mecanismos de ativação e supressão da

função imunológica, enfatizando que o principal efeito desse hormônio sob a função de células T é a imunossupressão. Os glicocorticoides parecem suprimir a inflamação mediada por macrófagos, células dendríticas e células epiteliais, e prejudica as respostas imunes citotóxicas, diminuindo a produção de interferon- γ e inibindo o desenvolvimento de células Th1, CD8⁺ e células natural killers (SHIMBA; IKUTA, 2020b).

Em animais não estressados aos 7 dias, foi observado que o grupo Endofill apresentou maior quantidade de células CD20⁺ quando comparado aos grupos controle e Sealapex. Comparando a resposta de cada grupo em função da presença ou não do estresse, observou-se que aos 7 dias o grupo controle não estressado apresentou maior quantidade de células CD20⁺ comparado ao grupo controle estressado. O estudo de Cain et al. (2017) presume que mudanças induzidas por glicocorticoides na migração das células B podem explicar, pelo menos em parte, a linfopenia B do sangue associada à infecção, inflamação, e severo estresse físico. O tratamento com glicocorticoides basicamente leva a redução no número de células B por indução de apoptose de suas células progenitoras (ANDERSON *et al.*, 2010; LILL-ELGHANIAN *et al.*, 2002). O estresse crônico demonstrou suprimir as respostas imunes protetoras ao mesmo tempo em que aumenta as respostas imunes pró-inflamatórias e dirigidas por citocinas (GLASER; KIECOLT-GLASER, 2005).

Enfatizamos que os níveis fisiológicos de glicocorticoides têm efeitos imunoestimulantes que, em contraste, em um estágio posterior e mais avançado de uma resposta imune, pode ocorrer uma imunossupressão mediada por glicocorticoides (DHABHAR, 2009). Nossa hipótese é que esses efeitos diferenciais alteraram algumas características da resposta inflamatória do tecido subcutâneo aos cimentos endodônticos.

Podemos observar que o estresse influenciou na resposta reparativa aos cimentos induzindo alterações na maturação de fibras colágenas.

O tipo de colágeno pode ser observado através da coloração de PSR. Comparando cada grupo em função do estresse, aos 7 dias, os grupos Controle, Sealapex e Endofill sem estresse não apresentaram diferença para os mesmos estressados, provavelmente por estar no processo inicial de reparo. As fibras imaturas são observadas em áreas que estão em processo de renovação de fibras de colágeno (CINTRA *et al.*, 2017c; DIEGELMANN; EVANS, 2004). Como é conhecido, as fases iniciais da cicatrização de feridas são marcadas por uma matriz provisória composta de plaquetas, fibrinas e fibronectina que passam por diferenciação de estruturas, organização e composição (ROGNONI *et al.*, 2018).

Já aos 30 dias, o processo de reparo foi atrasado em todos esses grupos estressados. As fibras maduras indicam áreas lesadas que estão em processo de reparo por períodos mais longos (CINTRA *et al.*, 2017c; DIEGELMANN; EVANS, 2004). O grupo AH Plus teve o processo de reparo atrasado tanto em 7 como em 30 dias pelo estresse. O estudo de Kitagawa *et al.* (2022), mostrou que o conteúdo de colágeno na pele diminuiu gradualmente após repetidos tratamentos de estresse. Estes resultados indicam que o estresse de contenção repetida pode afetar a saúde da pele através de mudanças tanto na composição de ácidos graxos quanto na concentração de aminoácidos em camundongos.

Por fim, uma capacidade interessante de um cimento endodôntico é a capacidade de formar partículas de cálcio nos tecidos, sendo esta capacidade analisada pela coloração von Kossa e pela luz polarizada (BUENO *et al.*, 2016; CINTRA *et al.*, 2017a; GOMES-FILHO *et al.*, 2012). Entre os cimentos avaliados, apenas a Sealapex foi capaz de estimular a formação de partículas de cálcio. Este resultado já era esperado devido aos compostos presentes no Sealapex, que contém hidróxido de cálcio, uma molécula capaz de promover a calcificação (BUENO *et al.*, 2016). Devemos também considerar que as técnicas von Kossa e observação em luz polarizada não indicam se o biomaterial é capaz de mineralizar tecidos (CINTRA *et al.*, 2017a), mas eles mostram se têm a capacidade para induzir a deposição de cálcio (BENETTI *et al.*, 2019; BUENO *et al.*, 2016, 2019; CINTRA *et al.*, 2017a). Dos cimentos utilizados, o único que é capaz de estimular a deposição de cálcio é o Sealapex (BUENO *et al.*, 2016; GOMES-FILHO *et al.*, 2012, 2016). A análise de vK e POL mostrou que o estresse não interferiu na capacidade do cimento Sealapex em depositar cálcio nos tecidos, porém analisando mais profundamente, pudemos observar que os animais estressados tanto em 7 como em 30 dias tiveram menor imunomarcagem para OSTEOCALCINA, mostrando que o estresse foi capaz de influenciar negativamente a quantidade de produção de osteocalcina pelos tecidos (NAPAL *et al.*, 1993; NICHOLSON *et al.*, 2002, PATTERSON-BUCKENDAHL *et al.*, 1988, 1995, 2001).

6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que o estresse crônico produzido por restrição física foi capaz de influenciar a resposta tecidual de cimentos endodônticos aumentando o infiltrado inflamatório e retardando o processo reparativo. Além disso, influenciou na redução da capacidade de biomineralização do material que possui esta habilidade.

REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular* 3rd ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2000.
- American National Standards Institute/Revised American National Standards Institute American Dental Association. Document No. 41 For recommended standard practices for biological evaluation of dental materials (1979). New York, NY: Am National Standards Institute.
- Anderson R, Franch A, Castell M, Perez-Cano FJ, Bräuer R, Pohlers D, Gajda M, Siskos AP, Katsila T, Tamvakopoulos C, Rauchhaus U, Panzner S, Kinne RW. Liposomal encapsulation enhances and prolongs the anti-inflammatory effects of water-soluble dexamethasone phosphate in experimental adjuvant arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(4):R147.
- Azevedo Queiroz IO, Mello WG, Martins CM, Dal Fabbro R, Narciso LG, Massunari L, Cintra LTA, Ervolino E, Gomes-Filho JE. Systemic bone marker expression induced by grey and white mineral trioxide aggregate in normal and diabetic conditions. *Int Endod J*. 2018;51(8):889-900.
- Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezan-Junior E, Cintra LTA. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. *Int Endod J*. 2014;47(7):615-21.
- Benetti F, Azevedo Queiroz ÍO, Oliveira PHC, Conti LC, Azuma MM, Oliveira SHP, Cintra LTA. Cytotoxicity and biocompatibility of a new bioceramic endodontic sealer containing calcium hydroxide. *Braz Oral Res*. 2019;33:e042.
- Benetti F, Bueno CRE, Reis-Prado AHD, Souza MT, Goto J, Camargo JMP, Duarte MAH, Dezan-Júnior E, Zanotto ED, Cintra LTA. Biocompatibility, Biomineralization, and Maturation of Collagen by RTR®, Bioglass and DM Bone® Materials. *Braz Dent J*. 2020;31(5):477-84.
- Black PH. Immune system-central nervous system interactions: Effect and immunomodulatory consequences of immune system mediators on the brain. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(1):7-12.
- Bueno CR, Valentim D, Marques VAS, Gomes-Filho JE, Cintra LTA, Jacinto RC, Dezan-Junio E. Biocompatibility and biomineralization assessment of bioceramic, epoxy, and calcium hydroxide-based sealers. *Braz. Oral Res*. 2016;30(1):1-9.

Bueno CRE, Vasques AMV, Cury MTS, Sivieri-Araújo G, Jacinto RC, Gomes-Filho JE, Cintra LTA, Dezan-Júnior E. Biocompatibility and biomineralization assessment of mineral trioxide aggregate flow. *Clin Oral Investig*. 2019;23(1):169-77.

Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009;33(7):1089-98.

Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(4):233-47.

Campeau S, Dolan D, Akil H, Watson SJ. c-fos mRNA induction in acute and chronic audiogenic stress: possible role of the orbitofrontal cortex in habituation. *Stress*. 2002;5(2):121-30.

Chancellor-Freeland C, Zhu GF, Kage R, Beller DI, Leeman SE, Black PH. Substance P and stress-induced changes in macrophages. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;771:472-84.

Chang SW, Bae WJ, Yi JK, Lee S, Lee DW, Kum KY, Kim EC. Odontoblastic differentiation, inflammatory response, and angiogenic potential of 4 calcium silicate-based cements: micromega MTA, ProRoot MTA, RetroMTA, and experimental calcium silicate cement. *J Endod*. 2015;41(9):1524-9.

Chrousos GP. Organization and Integration of the endocrine system. *Sleep Med Clin*. 2007;2(2):125-145.

Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*. 1995;332(20):1351-62.

Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, Lima VM, Sumida DH, Coclete GA, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Apical periodontitis and periodontal disease increase serum IL-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. *Clin Oral Investig*. 2014;18(9):2123-8.

Cintra LTA, Benetti F, Azevedo Queiroz ÍO, Araújo Lopes JM, Penha de Oliveira SH, Sivieri Araújo G, Gomes-Filho JE. Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new high-plasticity MTA material. *J Endod*. 2017a;43(5):774-778.

Cintra LTA, Benetti F, Azevedo Queiroz ÍO, Ferreira LL, Massunari L, Bueno CRE, Oliveira SHP, Gomes-Filho JE. Evaluation of the cytotoxicity and biocompatibility of new resin epoxy-based endodontic sealer containing calcium hydroxide. *J Endod*. 2017b;43(12):2088-92.

- Cintra LTA, Estrela C, Azuma MM, Queiroz ÍOA, 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):e68.
- Cintra LTA, Ferreira LL, Benetti F, Gastélum AA, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Briso ALF. The effect of dental bleaching on pulpal tissue response in a diabetic animal model. *Int Endod J.* 2017c;50(8):790-8.
- Cintra LTA, Samuel RO, Azuma MM, Queiróz AOS, Ervolino E, Sumida DH, Lima VMF, Gomes-Filho JE. Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. *J Endod.* 2016;42(5):747-51.
- Cosme-Silva L, Benetti F, Dal-Fabbro R, Gomes Filho JE, Sakai VT, Cintra LTA, Alvarez N, Ervolino E, Viola NV. Biocompatibility and biomineralization ability of Bio-C Pulpecto. A histological and immunohistochemical study. *Int J Paediatr Dent.* 2019a;29(3):352-60.
- Cosme-Silva L, Gomes-Filho JE, Benetti F, Dal-Fabbro R, Sakai VT, Cintra LTA, Ervolino E, Viola NV. Biocompatibility and immunohistochemical evaluation of a new calcium silicate-based cement, Bio-C Pulpo. *Int Endod J.* 2019b;52(5):689-700.
- Cosme-Silva L, Santos AFD, Lopes CS, Dal-Fabbro R, Benetti F, Gomes-Filho JE, Queiroz IOA, Ervolino E, Viola NV. Cytotoxicity, inflammation, biomineralization, and immunoexpression of IL-1 β and TNF- α promoted by a new bioceramic cement. *J Applied Oral Sci.* 2020;28:e20200033.
- Danese A, Lewis SJ. Psychoneuroimmunology of early-life stress: the hidden wounds of childhood trauma? *Neuropsychopharmacology.* 2017;42(1):99-114.
- Dantzer R, Wollman E, Vitkovic L, Yirmiya R. Cytokines and depression: Fortuitous or causative association? *Mol Psychiatry.* 1999;4(4):328-32.
- 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.
- Dhabhar FS. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation.* 2009;16(5):300-17.
- Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 2004;9:283-9.

- Dofferhoff AS, Vellenga E, Limburg PC, van Zanten A, Mulder PO, Weits J. Tumour necrosis factor (cachectin) and other cytokines in septic shock: a review of the literature. *Neth J Med.* 1991;39(1-2):45-62.
- Dragoş D, Tănăsescu MD. The effect of stress on the defense systems. *J Med Life.* 2010;3(1):10-8.
- Duarte MA, Demarchi AC, Moraes IG. Determination of pH and calcium ion release provided by pure and calcium hydroxide-containing AH Plus. *Int Endod J* 2004;37(1):42–5.
- Echeverry MB, Guimarães FS, Del Bel EA. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. *Neuroscience.* 2004;125(4):981-93.
- Elenkov IJ. Systemic stress-induced Th2 shift and its clinical implications. *Int Rev Neurobiol.* 2002;52:163-86.
- Encarnação RO. Estresse e produção animal. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC; 1986.
- Esterling BA, Kiecolt-Glaser JK, Glaser R. Psychosocial modulation of cytokine-induced natural killer cell activity in older adults. *Psychosom Med.* 1996;58(3):264-72.
- Farhad AR, Hasheminia S, Seyedmohammad R., Feizi M. Histopathologic evaluation of subcutaneous tissue response to three different sealers in rats. *J Oral Sci.* 2011;53(1):15-21.
- Gaffen SL. Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol.* 2011;23:613-9.
- Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(3):243-51.
- Godoy LD, Rossignoli MT, Delfino-Pereira P, Garcia-Cairasco N, Umeoka EHL. A comprehensive overview on stress neurobiology: basic concepts and clinical implications. *Front Behav Neurosci.* 2018;12:127.
- Gomes Filho JE, Queiroz ÍO, Watanabe S, Cintra LT, Ervolino E. Influence of diabetes mellitus on the mineralization ability of two endodontic materials. *Braz Oral Res.* 2016;30:S1806-83242016000100218.
- Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabé PF, Moraes Costa MT. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. *J Endod.* 2009;35:256-60.

Gomes-Filho JE, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LT, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Dezan E Jr, Bernabé PF. Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX®. *Dent Traumatol.* 2012;28(6):452-6.

Harris RB, Palmondon J, Leshin S, Flatt WP, Richard D. Chronic disruption of body weight but not of stress peptides or receptors in rats exposed to repeated restraint stress. *Horm Behav* 2006;49(5):615-25.

Harris RB, Zhou J, Youngblood BD, Rybkin II, Smagin GN, Ryan DH. Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low- and high-fat diets. *Am J Physiol.* 1998;275(6):R1928-38.

Hashmi S, Zeng QT. Role of interleukin-17 and interleukin-17-induced cytokines interleukin-6 and interleukin-8 in unstable coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2006;17(8):699-706.

Hauger RL, Millan MA, Lorang M, Harwood JP, Aguilera G. Corticotropin-releasing factor receptors and pituitary adrenal responses during immobilization stress. *Endocrinology.* 1988;123(1):396-405.

Hodgkin PD, Bond MW, O'Garra A, Frank G, Lee F, Coffman RL, Zlotnik A, Howard M. Identification of IL-6 as a T cell-derived factor that enhances the proliferative response of thymocytes to IL-4 and phorbol myristate acetate. *J Immunol.* 1988;141(1):151-7.

Holland R, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E, Murata SS. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. *J Endod.* 2002;28(3):173-6.

International Organization for Standardization. ISO 10993-6. Biological evaluation of medical devices. Part 6: tests for local effects after implantation. Porto: International Standard Norm; 2016.

International Organization for Standardization. ISO 10993-7. Biological evaluation of medical devices. Part 7: ethylene oxide sterilization residuals. Porto: International Standard Norm; 2008.

Iob E, Kirschbaum C, Steptoe A. Persistent depressive symptoms, HPA-axis hyperactivity, and inflammation: the role of cognitive-affective and somatic symptoms. *Mol Psychiatry.* 2020;25(5):1130-40.

Keller-Wood M. Hypothalamic-pituitary--adrenal axis-feedback control. *Compr Physiol.* 2015;5(3):1161-82.

- Kim KS, Han PL. Optimization of chronic stress paradigms using anxiety- and depression-like behavioral parameters. *J Neurosci Res.* 2006;83(3):497-507.
- Kim YK, Na KS, Myint AM, Leonard BE. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2016;64:277-84.
- Kitagawa Y, Hayakawa K, Oikawa D, Ikeda K, Ikeda M, Harada D, Furuse M. Repeated restraint stress modifies fatty acid and amino acid metabolism in the mouse skin. *J Vet Med Sci.* 2022;84(4):511-9.
- Koj A, Magielska-Zero D, Bereta J, Kurdowska A, Rokita H, Gauldie J. The cascade of inflammatory cytokines regulating synthesis of acute phase proteins. *Tokai J Exp Clin Med.* 1988;13(6):255-64.
- Kraemer RR, Chu H, Castracane VD. Leptin and exercise. *Exp Biol Med.* 2002;227(9):701-8.
- Kramer JM, Gaffen SL. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *J Periodontol.* 2007;78(6):1083-93.
- Levin BE, Richard D, Michel C, Servatius R. Differential stress responsivity in diet induced obese and resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279(4):R1357-64.
- Lill-Elghanian D, Schwartz K, King L, Fraker P. Glucocorticoid-induced apoptosis in early B cells from human bone marrow. *Exp Biol Med.* 2002;227(9):763-70.
- Liu S, Xu S, Wang Z, Guo Y, Pan W, Shen Z. Anti-depressant-like effect of sinomenine on chronic unpredictable mild stress-induced depression in a mouse model. *Med Sci Monit.* 2018;24:7646-53.
- Maccari S, Morley-Fletcher S. Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations. *Psychoneuroendocrinology.* 2007;32(Suppl 1):S10-5.
- Macedo IC. Estresse crônico associado á dieta hipercalórica em ratos Wistar: parâmetros ponderais e bioquímicos [dissertação]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.
- Mansi JA, Drolet G. Chronic stress induces sensitization in sympathoadrenal responses to stress in borderline hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1997;272(3 Pt 2):R813-20.

- Martins CM, Gomes-Filho JE, Queiroz IOA, Ervolino E, Cintra LTA. Hypertension undermines mineralization-inducing capacity of and tissue response to mineral trioxide aggregate endodontic cement. *J Endod.* 2016;42(4):604-9.
- Matallah A, Guezi R, Bairi A. Repeated restraint stress induced neurobehavioral and sexual hormone disorders in male rats. *AIMS Neurosci.* 2022;9(2):264-76.
- Mayer P, Geissler K, Valent P, Ceska M, Bettelheim P, Liehl E. Recombinant human interleukin 6 is a potent inducer of the acute phase response and elevates the blood platelets in nonhuman primates. *Exp Hematol.* 1991;19(7):688-96.
- McCann SM, Lyson K, Karanth S, Gimeno M, Belova N, Kamat A, Rettori V. Mechanism of action of cytokines to induce the pattern of pituitary hormone secretion in infection. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;771:386-95.
- McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN, Nasca C. Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci.* 2015;18(10):1353-63.
- Minhoto GB, Khoury RD, Orozco EIF, Prado RF, Valera MC. Effect of chronic unpredictable stress on the progression of experimental apical periodontitis in rats. *Int Endod J.* 2021;54(8):1342-52.
- Mograbi KM, Suchecki D, Silva SG, Covolan L, Hamani C. Chronic unpredictable restraint stress increases hippocampal pro-inflammatory cytokines and decreases motivated behavior in rats. *Stress.* 2020;23(4):427-36.
- Morgental RD, Vier-Pelisser FV, Oliveira SD, Antunes FC, Cogo DM, Kopper PM. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *Int Endod J.* 2011;44(12):1128-33.
- Napal J, Amado JA, Riancho JA, Olmos JM, Gonzalez-Macias J. Stress decreases the serum level of osteocalcin. *Bone Miner.* 1993;21(2):113-8.
- Nibali L, Fedele S, D'Aiuto F, Donos N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral Dis.* 2012;18(3):236-43.
- Nicholson G, Bryant AE, Macdonald IA, Hall GM. Osteocalcin and the hormonal, inflammatory and metabolic response to major orthopaedic surgery. *Anaesthesia.* 2002;57(4):319-25.

Nusslock R, Miller GE. Early-Life adversity and physical and emotional health across the lifespan: a neuroimmune network hypothesis. *Biol Psychiatry*. 2016;80(1):23-32.

Oliveira PHC, Gomes Filho JE, Rodrigues MJDS, Silva CC, Cardoso CDBM, Cosme da Silva L, Ervolino E, Cintra LTA. Influence of supplement administration of omega-3 on the subcutaneous tissue response of endodontic sealers in Wistar rats. *Int Endod J*. 2022;55(10):1026-41.

Oliveira RL, Oliveira Filho RS, Gomes HC, Franco MF, Enokihara MM, Duarte MA. Influence of calcium hydroxide addition to AH Plus sealer on its biocompatibility. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(1):e50-4.

Orstavik D. Endodontics materials. *Adv Dent Res*. 1988;2(1):12-24.

Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Choi DC, Richtand NM, Herman JP. Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. *Endocrinology*. 2006;147(4):2008-17.

Paré WP, Glavin GB. Restraint stress in biomedical research: a review. *Neurosci Biobehav Rev*. 1986;10(3):339-70.

Patterson-Buckendahl P, Kvetnansky R, Fukuhara K, Cizza G, Cann C. Regulation of plasma osteocalcin by corticosterone and norepinephrine during restraint stress. *Bone*. 1995;17(5):467-72.

Patterson-Buckendahl P, Rusnak M, Fukuhara K, Kvetnansky R. Repeated immobilization stress reduces rat vertebral bone growth and osteocalcin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;280(1):R79-86.

Patterson-Buckendahl PE, Grindeland RE, Shakes DC, Morey-Holton ER, Cann CE. Circulating osteocalcin in rats is inversely responsive to changes in corticosterone. *Am J Physiol*. 1988;254(5 Pt 2):R828-33.

Peruzzo DC, Benatti BB, Antunes IB, Andersen ML, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH, Nogueira-Filho GR. Chronic stress may modulate periodontal disease: a study in rats. *J Periodontol*. 2008;79(4):697-704.

Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytok Growth Fact Rev*. 2003;14:185-91.

- Rognoni E, Pisco AO, Hiratsuka T, Sipilä KH, Belmonte JM, Mobasser SA, Philippos C, Dillão R, Watt FM. Fibroblast state switching orchestrates dermal maturation and wound healing. *Mol Syst Biol*. 2018;14(8):e8174.
- Rohleder N. Stress and inflammation: the need to address the gap in the transition between acute and chronic stress effects. *Psychoneuroendocrinology*. 2019;105:164-71.
- Roitt, IV, Brustoff J, Male D. *Imunologia*. 5th ed. São Paulo: Atheneu; 1999.
- Samuel RO, Ervolino E, de Azevedo Queiroz ÍO, 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.
- Sasse SK, Greenwood BN, Masini CV, Nyhuis TJ, Fleshner M, Day HE, Campeau S. Chronic voluntary wheel running facilitates corticosterone response habituation to repeated audiogenic stress exposure in male rats. *Stress*. 2008;11(6):425-37.
- Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE, Tew JG. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res*. 2010;89:943-7.
- Shimba A, Ikuta K. Control of immunity by glucocorticoids in health and disease. *Semin Immunopathol*. 2020a;42(6):669-80.
- Shimba A, Ikuta K. Immune-enhancing effects of glucocorticoids in response to day-night cycles and stress. *Int Immunol*. 2020b;32(11):703-8.
- Shin AC, MohanKumar SM, Sirivelu MP, Claycombe KJ, Haywood JR, Fink GD, MohanKumar PS. Chronic exposure to a high-fat diet affects stress axis function differentially in diet-induced obese and diet-resistant rats. *Int J Obes*. 2010;34(7):1218-26.
- Siegel S. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. New York: McGraw Hill; 1956.
- Silva ECA, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Delfino MM, Cerri PS, Guerreiro-Tanomaru JM. Biocompatibility and bioactive potential of new calcium silicate-based endodontic sealers: Bio-C sealer and sealer plus BC. *J Endod*. 2020;46(10):1470-7.
- Silva EJ, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BP, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod*. 2013;39(2):274-7.

- Silva EJNL, Zaia AA, Peters AO. Cytocompatibility of calcium silicate-based sealers in a three-dimensional cell culture model. *Clin Oral Invest*. 2017;21:1531-6.
- Silva GF, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri OS. Niobium pentoxide as radiopacifying agent calcium silicate-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clin Oral Investig*. 2015;19:2012–25.
- Smagin GN, Howell LA, Redmann S Jr, Ryan DH, Harris RB. Prevention of stress-induced weight loss by third ventricle CRF receptor antagonist. *Am J Physiol*. 1999;276(5):R1461-8.
- Spiga F, Walker JJ, Terry JR, Lightman SL. HPA axis-rhythms. *Compr Physiol*. 2014;4(3):1273-98.
- Tamashiro KL, Nguyen MM, Ostrander MM, Gardner SR, Ma LY, Woods SC, Sakai RR. Social stress and recovery: implications for body weight and body composition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(5):R1864-74.
- Tansey MG, Szymkowski DE. The TNF superfamily in 2009: new pathways, new indications, and new drugs. *Drug Discov Today*. 2009;14(23-24):1082-8.
- Torabinejad M, Kettering JD. Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J Endod*. 1985;11(3):122-5
- Torres IL, Gamaro GD, Silveira-Cucco SN, Michalowski MB, Corrêa JB, Perry ML, Dalmaz C. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO₂ in hippocampal and cerebral cortex slices. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(1):111-6.
- Vallieres L, Rivest S. Interleukin-6 is a needed proinflammatory cytokine in the prolonged neural activity and transcriptional activation of corticotropin-releasing factor during endotoxemia. *Endocrinology*. 1999;140(9):3890-903.
- Wang M, Dong W, Wang R, Xu X, Wu Y, Sun G, Sun X. *Gastrodiae rhizoma* water extract ameliorates hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivity and inflammation induced by chronic unpredictable mild stress in rats. *Biomed Res Int*. 2020;2020:8374614.
- Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*. 1997;134:319–29.

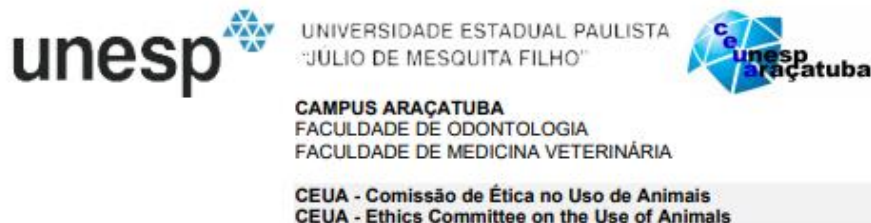
Zakharova M, Ziegler HK. Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF-alpha: inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. *J Immunol.* 2005;175:5024-33.

Zhang W, Li Z, Peng B. Effects of iRoot SP on mineralization-related genes expression in MG63 cells. *J Endod.* 2010;36(12):1978-82.

Zmener O, Martinez Lalis R, Pameijer CH, Chaves C, Kokubu G, Grana D. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. *J Endod.* 2012;38(9):1233-8.

ANEXOS

ANEXO A – Comitê de Ética em Experimentação Animal



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Influência do estresse por retenção sobre a resposta tecidual de cimentos endodônticos**", Processo FOA nº 0250-2021, sob responsabilidade de Luciano Tavares Angelo Cintra apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Junho de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 24 de Junho de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 24 de Julho de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Influence of retention stress on the tissue response of endodontic sealers**", Protocol FOA nº 0250-2021, under the supervision of Luciano Tavares Angelo Cintra presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 24, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: June 24, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: July 24, 2023.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator