



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

GIOVANNA BIGNOTO MINHOTO

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

2019

GIOVANNA BIGNOTO MINHOTO

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

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

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

Orientadora: Profa. Titular Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2019

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

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

Minhoto, Giovanna Bignoto

Estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pelo estresse crônico e seu efeito na progressão da lesão periapical / Giovanna Bignoto Minhoto. - São José dos Campos : [s.n.], 2019.
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2019.
Orientadora: Marcia Carneiro Valera.

1. Estresse . 2. Periapical. I. Valera, Marcia Carneiro, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Marcia Carneiro Valera (Orientador)

Universidade Júlio de Mesquita Filho

Instituto de Ciência e Tecnologia

São José dos Campos

Luana Marotta Reis de Vasconcelos

Universidade Júlio de Mesquita Filho

Instituto de Ciência e Tecnologia

São José dos Campos

Mariella Vieira Pereira Leão

Universidade de Taubaté (Unitau)

São José dos Campos, 06 de Dezembro de 2019.

DEDICATÓRIA

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

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

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

AGRADECIMENTO ESPECIAL

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

AGRADECIMENTO

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

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

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

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

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

Saiba que você é uma irmã pra mim.

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

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

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

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

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

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

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

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP** que
concedeu bolsa de mestrado (Processo n^o 2018/12438-4).

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

Muito obrigada!

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

Arthur Schopenhauer

SUMÁRIO

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lesão Periapical

Takehashi et al. (1965) avaliaram as alterações patológicas resultantes da exposição da polpa não tratada em ratos livres de germes em comparação com ratos convencionais. Os tecidos pulparem foram expostos através da perfuração da superfície oclusal do primeiro molar superior direito com uma broca circular. Após 18 dias, verificaram que no grupo convencional, o tecido pulpar encontrava-se totalmente necrosado e com formação de abscesso na região periapical. No grupo livre de germes não foi observado necrose pulpar ou abscessos. Concluiu-se então que os microorganismos estão diretamente ligados as alterações pulparem e periapicais.

Em 1981 um estudo realizado por Moller et al., com o objetivo de confirmar o papel dos microorganismos na etopatogenia das lesões periapicais, induziram de forma asséptica e séptica, necrose em dentes de macacos após 6 a 7 meses. Realizou-se as análises clínica, radiográfica, microbiológica e histológica que evidenciaram nos casos de polpas necrosadas e não infectadas, tecidos periapicais desprovidos de inflamação e indícios de reparação; enquanto nos dentes com polpa infectada, houve sempre o desenvolvimento de lesões periapicais.

Kawashima e Stashenko (1990) realizaram um estudo para avaliar a cinética da expressão de 10 citocinas em lesões periapicais induzidas experimentalmente. A proteína IL-1 α e TNF α foram altamente expressas, começando no dia 7 e aumentaram até o dia 28. A IL-6 aumentou no dia 14 e depois diminuiu, enquanto a IL-11 não foi modulada pela exposição pulpar. Correlações positivas foram observadas entre os níveis de mediadores pró-inflamatórios IL-2, IL-12, TNF α e IFN. Estes resultados analisados mostraram que uma rede de citocinas é ativada no periápice em resposta à infecção bacteriana.

Stashenko et al. (1992) realizaram exposições experimentais em todos os dentes molares de ratos, os quais foram deixados abertos ao meio oral para indução de uma lesão periapical, os animais foram eutanasiados em diferentes períodos.

Através da imagem radiográfica observou-se que a maioria dos dentes exibiam lesões no 15^o dia. Observou-se também que as lesões permaneciam razoavelmente estáveis em tamanho até o 20^o dia. Um modelo rápido de expansão da lesão e destruição óssea ocorreu entre os dias 1 e 15 após a exposição, indicando a fase ativa da lesão, a partir de então observou-se uma fase crônica caracterizada pela estabilização da lesão a partir de então. As células T auxiliares predominam na fase ativa, já as células T supressoras está associada a cronicidade. Os níveis mais altos de atividade de reabsorção óssea estão presentes durante a fase ativa do que na fase crônica.

Wang e Stashenko (1993) utilizaram modelo animal para analisar as fases ativas e crônicas da destruição óssea. Porções de tecido inflamatório das lesões ativas com níveis altos de reabsorção óssea

O ativador de receptor do ligante Kappa B do fator nuclear (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG) são expressos em lesões periapicais (Teitelbaum et al., 2000; Theill et al., 2002).

Em 2007 Kawashima et al., realizaram um estudo com o objetivo de elucidar a cinética do receptor ativador do ligante NKK β (RANKL), RANK, osteoprotegerina (OPG) e expressão de citocinas em lesões periapicais de ratos induzidas experimentalmente. As lesões foram induzidas em ratos Wistar machos através da exposição de polpa em molares inferiores. Através da análise de PCR concluiu-se que a expressão de RANKL e citocinas pró-inflamatórias está associada a expansão da lesão periapical.

Menezes et al. (2008) avaliou os padrões de RNAm de RANKL e OPG em granulomas periapicais humanos e os comparou com locais com atividade característica de reabsorção óssea: saudáveis, fibras do ligamento periodontal, gengiva saudável, gengivite crônica e periodontite crônica. Observou-se que a expressão de RNAm de ambos, RANKL e OPG, foi maior em granulomas periapicais quando comparado com o ligamento periodontal saudável. Lesões com imagem radiográfica menor que 5mm apresentaram maior expressão de RANKL/OPG do que imagens maiores que 5 mm.

Fan et al. (2008) avaliaram a expressão de mediadores envolvidos com o mecanismo de reabsorção óssea, RANKL e OPG em granuloma periapical humano

(GP) e cisto radicular (CR) caracterizados por destruição óssea periapical através da imunohistoquímica. Como grupo controle, obteve-se tecido do ligamento periodontal saudável a partir de dentes extraídos por indicação ortodôntica. Os resultados mostraram que a expressão de RANKL foi significativamente maior nos granulomas periapicais e cistos radiculares comparado ao grupo controle. A expressão de OPG não apresentou significância estatística. Os autores concluíram que RANKL deve ser responsável pela reabsorção óssea em lesões periapicais.

Em 2011 outro estudo foi realizado por Fan et al., investigando a possível associação entre a expressão de reguladores de reabsorção óssea (RANKL e OPG) e a infiltração de células inflamatórias na periodontite apical crônica. Foram analisadas por imunohistoquímica 40 lesões periapicais crônicas e comparadas a tecidos periapicais saudáveis quanto a expressão de RANKL e OPG. As amostras da lesão também foram avaliadas quanto ao infiltrado inflamatório. Os resultados mostraram que o número de células RANKL positivas e proporção de RANKL/OPG na periodontite apical crônica foram significativamente maiores do que em tecidos periapicais saudáveis. Verificou-se também que o número de células positivas a RANKL foi maior nas lesões com infiltração inflamatória grave.

Rechenberg et al. (2014) realizaram um estudo para avaliar os níveis de RANKL, OPG e IL-8 no fluido periapical de dentes humanos com pulpite irreversível sintomática e assintomática. As amostras do fluido periapical foram coletadas com cone de papel e avaliadas por ELISA. RANKL foi expresso em níveis significativamente mais altos na pulpite irreversível sintomática, enquanto os níveis de OPG estavam abaixo dos níveis de detecção. Já os níveis de IL-8 foram menores nas pulpites irreversíveis sintomáticas. Este estudo sugere que a reabsorção óssea determinada pela presença de RANKL, ocorre antes da sinalização de recrutamento de células inflamatórias.

Salinas-Muñoz et al. (2017) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar os níveis dos biomarcadores de reabsorção óssea, como: TRAP-5, RANKL e OPG em periodontites apicais sintomáticas e assintomáticas. Tecidos apicais de pacientes com periodontite apical sintomática e assintomática e ligamentos periodontais de dentes sadios extraídos por razões ortodônticas foram processados para análise. Os níveis de RANKL, OPG foram significativamente mais altos nas lesões periapicais sintomáticas e assintomáticas do que em tecido periapical

saudável. Já os níveis de TRAP-5 foram mais elevados nas periodontites apicais sintomáticas.

Kaneko et al. (2019) avaliaram os efeitos do RANKL no tratamento de lesões periapicais induzidas. Foram utilizados ratos Wistar com 5 semanas de idade e induziu-se a lesão periapical nos primeiros molares, aplicando lipopolissacarídeo na câmara pulpar. RANKL foi injetado intraperitonealmente por 7 dias, iniciando no primeiro dia depois da exposição pulpar. Após 28 dias as amostras foram coletadas, realizou-se as radiografias e na sequência as amostras foram processadas para imuno-histoquímica, laser de captura, ensaio de imunoabsorção enzimática e Western Blotting. A utilização de NF- κ B reduziu significativamente a lesão periapical, também mostrou regular CXCL1 e CXCR2.

Saritekin et al. (2019) avaliou o efeito sistêmico da administração de melatonina na inflamação e na reabsorção óssea em ratos em que foi induzida a lesão periapical. Foram utilizados 30 ratos que foram divididos nos seguintes grupos: grupo controle e melatonina. A câmara pulpar dos primeiros molares foi exposta com a finalidade de induzir a lesão periapical. O grupo melatonina recebeu todos os dias injeções intraperitoneais. Após 21 dias, os animais foram eutanasiados, as hemimandíbulas foram preparadas para análise radiográfica, histopatológica e imuno-histoquímica. Observou-se que a área da destruição óssea foi significativamente menor em ratos que receberam injeções intraperitoneais de melatonina. Na análise histomorfométrica a área da lesão periapical também se mostrou menor no grupo melatonina comparado ao grupo controle. A expressão de IL1 β , RANKL e RANK foi significativamente maior no grupo controle.

2.2 Estresse Crônico e perda óssea

Genco et al. (1999) avaliaram em um estudo transversal com indivíduos de 25 a 74 anos, os quais preencheram questionários psicossociais que medem traços e atitudes psicológicas, como o estresse crônico. Foi realizada também a avaliação clínica da placa supragengival, profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e altura radiográfica alveolar. Verificou-se que aqueles com maior estresse

financeiro tinham maiores riscos de perda óssea considerável do que aqueles com baixo nível de estresse financeiro.

Em 2002 Gasperic et al., avaliaram a influência do estresse na progressão da doença periodontal de ratos Wistar induzida pela colocação de ligaduras de seda ao redor do dente. Os ratos foram divididos em três grupos com 10 animais em cada; o primeiro grupo foi exposto ao estresse de imobilização que o impedia de ter acesso a água e comida por 12 horas, o segundo grupo passou pelo mesmo estresse porém com duração de 4 horas e o terceiro grupo não recebeu nenhum tipo de estresse. Após 4 semanas realizou-se a eutanásia para posterior análise histomorfométrica. O estresse combinado com ligadura resultou em uma perda significativamente maior de inserção e reabsorção óssea alveolar do que qualquer tratamento isolado, não houve diferença entre os dois regimes de estresse.

Em 2007 Peruzzo et al. realizaram uma revisão sistemática relacionando o estresse crônico com a doença periodontal. Os resultados mostraram que dos 14 artigos selecionados, 57,1% consideraram relevante o estresse sobre a doença periodontal, 28,5% consideraram aspectos positivos e negativos e 14,2% encontraram resultado negativo.

Peruzzo et al., (2008) avaliaram o efeito do estresse crônico na doença periodontal induzida por ligadura. Utilizaram 60 ratos Wistar machos foram divididos em três grupos: G1(grupo controle); G2 (doença periodontal); G3 (doença periodontal associada com estresse); Após 30 dias, todos os animais foram sacrificados por decapitação. Coletou-se o sangue e avaliou-se o nível da corticosterona sanguínea, além da análise histomorfométrica para medir a área de osso perdido. O estresse crônico aumentou os níveis de biomarcadores de estresse, além de aumentar a perda óssea periodontal.

Semenoff-Segundo em 2012 avaliou a influência do estresse crônico em ratas grávidas na sua prole adulta em relação a perda óssea induzida. Dez fêmeas e 5 machos foram alocados sendo duas fêmeas para cada macho para o acasalamento, após confirmação da gravidez as ratas foram divididas em dois grupos, foram separados em dois grupos sendo metade o grupo controle e a outra metade o grupo que recebeu o estresse (imobilização em ambiente frio) por 11 dias. Após o nascimento 24 ratos machos foram selecionados já na divisão dos dois grupos. Induziu-se a lesão periodontal e 60 dias após realizou-se a eutanásia para

análise histológica e histomorfométrica. Observou-se maior perda óssea nos grupos estressados.

Em 2013 Semenoff et al., avaliaram o efeito do estresse crônico em ratos recém-nascidos na progressão da periodontite. Dez casais de ratos Wistar adultos foram selecionados para o acasalamento, após o nascimento dividiu-se em dois grupos: Grupo de ligadura (em que os filhotes foram apenas observados durante o período de amamentação) e o Grupo ligadura e estresse: após 24 horas de vida, os filhos foram afastados de suas mães todos os dias durante 4 horas durante o período de amamentação de 20 dias. Em seguida a doença periodontal foi induzida nos segundos molares superiores direitos. Realizou-se a eutanásia 15 dias após a indução da lesão para posterior análise radiográfica. Observou-se um aumento da perda óssea no grupo de ligadura e estresse em relação ao grupo ligadura.

Lu et al., em (2014) avaliaram a progressão da periodontite induzida por ligadura associada ao estresse crônico. Foram utilizados 120 ratos Wistar machos divididos em 4 grupos: G1(grupo controle), G2(estresse crônico), G3 (periodontite induzida por ligadura) e G4 (ligadura mais estresse crônico). Nos grupos G3 e G4 foi realizado o procedimento cirúrgico, em que se colocou fio de sutura ao redor dos primeiros molares. O estresse crônico foi aplicado no G2 e G4, iniciando-se no quarto dia após a indução da lesão periodontal e mantida por um período de 4 semanas. Os resultados mostraram que o estresse crônico aumenta o nível de corticosterona dos animais, estimula o aumento da perda óssea e aumenta a reação inflamatória.

Gomes et al. (2019) realizaram um estudo com o objetivo de observar se o estresse condicionado aumentava a reabsorção óssea em periodontites apicais em ratos Wistar machos. Utilizaram 25 animais que foram divididos em dois grupos, realizou-se o procedimento cirúrgico nos primeiros molares esquerdos para exposição da polpa para indução uma inflamação periapical, essa exposição perdurou por 56 dias. O grupo controle não recebeu nenhum tipo de estresse, já o grupo experimental recebeu estímulos elétricos (1.10 mA). As mandíbulas esquerdas foram removidas para análise histológica e radiográfica. O grupo estressado apresentou um aumento da perda óssea periapical e um número maior de células inflamatória da região do ápice do canal. Não houve diferença quanto as radiografias.

2.3 Avaliação microtomográfica

Von Stencho et al. (2003) realizaram um estudo para avaliar se uma quantificação volumétrica tridimensional da reabsorção óssea poderia ser alcançada e se isso se relaciona com as medidas bidimensionais. Lesões perirradiculares foram induzidas nos primeiros molares inferiores de camundongos por exposição pulpar. As mandíbulas foram removidas no 21^o dia e submetidas a tomografia computadorizada e histologia convencional. Os resultados mostraram uma correlação positiva entre o volume da lesão e a área de lesão bidimensional pela histologia. Concluiu-se então que a análise tridimensional é altamente correlacionada as medidas lineares da análise histológica, mas a microtomografia permite avaliação de características microestruturais adicionais.

Trisi et al. (2006) realizaram o enxerto de três seios maxilares com um substituto ósseo de vidro bioativo misturado com osso autógeno. Em dois dos três seios foi adicionado um gel de plasma rico em plaquetas. Realizou-se biópsias após 5,6 e 15 meses e analisadas por Micro- CT e histomorfometria. Os valores de microtomografia foram muito confiáveis em comparação com a histomorfometria.

Park et al. (2007) investigaram metodologias de micro-tomografia computadorizada para quantificar o osso alveolar de suporte dentário, após situações clínicas de periodontite. Perda óssea experimental em ratos e regeneração foram desenvolvidas. A micro-CT e os softwares digitalizados foram reconstruídos tridimensionalmente para avaliar parâmetros lineares e volumétricos de osso alveolar. Os resultados mostraram que a metodologia foi altamente confiável e reproduzível, concluindo-se então que as medidas 3-D podem fornecer melhor análise de perda óssea que os métodos 2-D.

Yang et al. (2014) investigaram a dinâmica da expressão de Th17 na lesão periapical de ratos e sua correlação com a reabsorção óssea. Foi realizada a exposição pulpar dos primeiros molares de 28 ratos Wistar para que fosse induzida a lesão periapical. Os animais foram eutanasiados nos dias 0, 7, 21 e 35. As mandíbulas foram preparadas para escaneamento microtomográfico, análise histológica, imuno-histoquímica e imunofluorescência. Observou-se que o volume e

a área da lesão periapical aumentou visivelmente do dia 7 pro dia 21 e aumentou devagar entre os dias 21 e 35.

De Oliveira et al. (2015) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a correlação da análise histomorfométrica da lesão periapical e a análise microtomográfica obtidas de animal experimental. Foi realizada a exposição pulpar e após 7, 21 e 42 dias os animais foram eutanasiados. As mandíbulas foram avaliadas por microtomografia computadorizada e então foram preparadas pro processamento histológico. A lesão periapical foi mensurado por softwares. Concluiu-se que a microtomografia permite uma análise precisa do volume da lesão periapical.

Suzuki et al. (2015) avaliaram os efeitos do NC-2300 na inflamação e na destruição óssea em lesão periapical de ratos. Foram expostas as câmaras pulpares dos primeiros molares para que induzisse a lesão periapical. NC-2300 e fosfato tamponado foram administrados duas vezes ao dia para o grupo controle e para o grupo experimental. Os animais foram sacrificados após 21 dias e as mandíbulas foram coletadas para análise microtomográfica e histológica. A mandíbula direita foi realizada a extração de RNA dos tecidos ao redor da lesão periapical para analisar a expressão de mediadores inflamatórios. O tamanho da lesão periapical diminuiu significativamente se comparado ao grupo controle. A expressão de citocinas pró inflamatórias no grupo experimental foi significativamente menor quando comparado ao grupo controle.

Wayama et al. (2015) realizaram um estudo para investigar os efeitos sistêmicos da administração de ácido zoledrônico (ZOL) na progressão da lesão periapical em ratos com deficiência de estrógeno. Os animais foram divididos em 4 grupos: SHAM-veh (falsa cirurgia, tratado com veículo), OVX-veh (ovariectomia, tratado com veículo), SHAM-ZOL (falsa cirurgia, tratado com ZOL) e OVX-ZOL (ovariectomia, tratado com ZOL). O veículo ou o ZOL eram administrados intravenoso uma vez na semana por 4 semanas. Foi realizada a exposição pulpar dos primeiros molare de todos os ratos, para induzir a lesão periapical, as lesões foram avaliadas após 7 e 30 dias por microtomografia computadorizada. Observou-se que o grupo OVX-veh teve uma maior perda óssea que os demais grupos nos dois períodos avaliados. Concluindo-se que a administração de ZOL pode ajudar a conter a destruição óssea de lesões periapicais.

Martins et al. (2016) compararam aspectos das lesões periapicais em hipertensos e normotensos. Realizou-se a exposição pulpar dos primeiros molares. Realizou-se a eutanásia após 21 dias e coletou-se as mandíbulas direitas para análise microtomográfica. As proteínas foram extraídas da lesão periapical do lado esquerdo para analisar a expressão de IL 1 α , IL1 β e TNF α por ELISA. Observou-se que o tamanho da lesão periapical e a expressão de citocinas pró-inflamatórias não diferiram entre os grupos.

Aksoy et al. (2019) investigaram o possível efeito terapêutico do ácido alfa lipóico em modelo animal de periodontite apical crônica. Foram utilizados 32 ratos Wistar divididos em 4 grupos: grupo controle, grupo ALA (ácido alfa lipóico), grupo AP (periodontite apical), grupo AP+AL (periodontite apical + ácido alfa lipóico). Nos últimos dois grupos (AP e AP+ALA) as câmaras pulpares foram expostas ao meio bucal para indução da lesão. Os grupos controle e AP foram tratados com solução salina aplicada intraperitoneal. Os grupos ALA e AP+ALA foram aplicados ALA intraperitoneal por 28 dias após a indução da lesão periapical. As mandíbulas foram coletadas e avaliadas por microtomografia e observou-se que o grupo AP+AL exibiu valores significativamente menores de área e volume de reabsorção apical.

3 PROPOSIÇÃO

- ☐ Avaliar o efeito do estresse crônico no desenvolvimento da lesão periapical em diferentes períodos de sua evolução;
- ☐ Verificar qual o melhor período para avaliar o desenvolvimento da lesão em animais submetidos ao estresse crônico;
- ☐ Avaliar a destruição óssea periapical por análise histológica e por microtomografia;
- ☐ Avaliar a destruição óssea via RANKL e OPG;
- ☐ Comprovar o estresse por análise dos níveis de corticosterona e peso dos animais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (CEPa) do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos- ICT-UNESP (11/2018- CEUA- ICT-CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS – UNESP). Para este trabalho foram utilizados 48 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, os animais pesavam aproximadamente 250 gramas, 90 dias de vida e durante o experimento foram alojados no biotério do ICT-UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas em temperatura ambiente e alimentados com ração e água *ad libitum* exceto durante o período do estresse no qual permaneciam privados de água ou de ração de acordo com o sorteio do estresse.

Os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos com estresse (E) e sem estresse (SE) e em 6 subgrupos (Figura1):

a) Grupo experimental com estresse (E): os 24 animais em que foi induzida periapicopatia, foram submetidos à protocolo experimental de indução de estresse. Os animais começaram a ser submetidos ao estresse 21 dias antes do início da indução da lesão e foram mantidos sob estresse durante todo experimento. Após o início da indução da lesão periapical os animais foram divididos em 3 subgrupos de acordo com o tempo de indução da lesão.

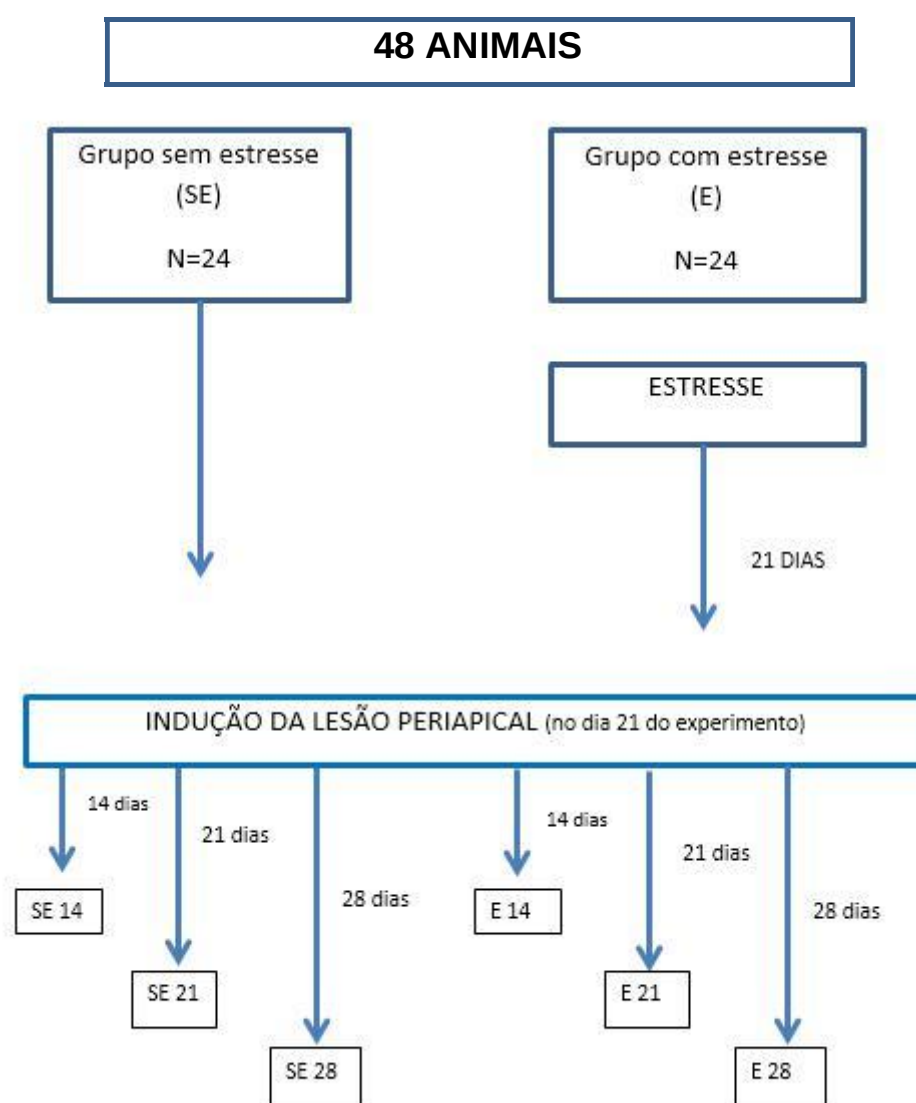
- E14- Eutanásia realizada 14 dias após a indução da lesão (N=8);
- E21- Eutanásia realizada 21 dias após a indução da lesão (N=8);
- E28- Eutanásia realizada 28 dias após a indução da lesão (N=8);

b) (SE) Grupo sem estresse: os 24 animais em que foi induzido a periapicopatia e não receberam estresse. Foram divididos em 3 subgrupos de acordo com o tempo de indução da lesão.

- SE14- Eutanásia realizada 14 dias após o início da indução da lesão (N=8);

- SE21- Eutanásia realizada 21 dias após o início da indução da lesão (N=8);
- SE28- Eutanásia realizada 28 dias após o início da indução da lesão (N=8).

Figura 1- Organograma dos grupos



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1 Procedimento de pesagem dos animais

Todos os animais foram pesados no 1^o dia do experimento e no dia da eutanásia, através de uma balança analógica, com a finalidade de verificar a diferença no ganho de peso dos animais entre os grupos. A partir da coleta do peso inicial, realizou-se a tabulação dos dados para verificar se havia diferença estatística entre os grupos, o mesmo foi feito a partir do peso final dos animais.

Figura 2- Procedimento de pesagem dos animais



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Indução da Periapicopatia

Os procedimentos de indução da necrose pulpar foram realizados em uma sala limpa e climatizada, em bancadas cuidadosamente desinfetadas, utilizando-se álcool 70%, e com instrumentais devidamente esterilizados. Os animais foram anestesiados com solução 13mg/kg de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompun- Bayer do Brasil), e 33 mg/Kg de ketamina base (Dopalen-Agribands do Brasil Ltda), via intramuscular. Foi realizada a antisepsia da porção posterior da mandíbula do lado esquerdo com solução de clorexidina a 2%. Para indução da necrose pulpar foi utilizado o protocolo proposto por Scarparo et al. (2012). As polpas dentais dos primeiros molares inferiores esquerdos foram expostas através da abertura coronária na fossa distal, situada mesialmente à

cúspide distal na face oclusal com brocas esféricas em alta rotação #1011HL (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil), na profundidade do diâmetro da broca- 1 mm, tomando-se cuidado para não perfurar a furca. Em seguida, Limas K #10,15,20 e 25 (DentsplyMaillefer, Ballaigues, Switzerland), delimitadas com cursor de borracha, foram utilizadas para remoção do remanescente pulpar para prevenir sintomatologia dolorosa no período pós-operatório (Figura 3). As cavidades ficaram expostas ao meio bucal pelo período de até 28 dias com objetivo de induzir a contaminação bacteriana e consequente lesão periapical inflamatória.

Figura 3 – Procedimento para indução da periapicopatia

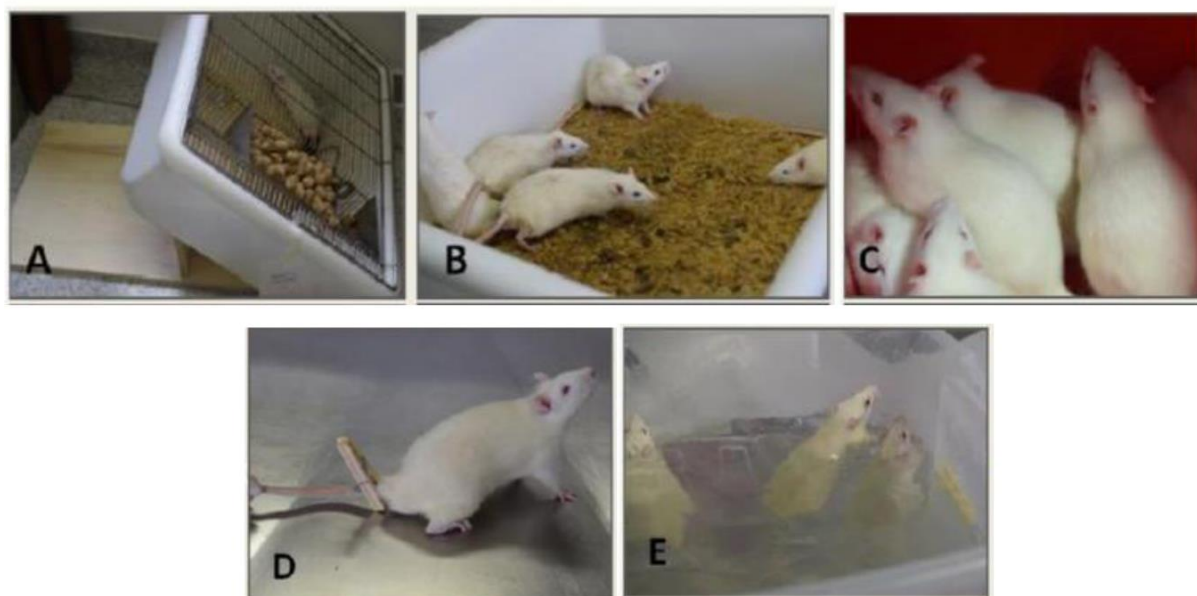


Legenda: a) Injeção anestésica intramuscular; b) Dispositivo para abertura de boca do animal; c) Abertura coronária, exposição da cavidade pulpar e extirpação do remanescente pulpar.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Indução do estresse crônico

O estresse crônico iniciou 21 dias antes da indução da periapicopatia e foi realizado conforme o protocolo de Willner com adaptações (Lu et al., 2015). Durante todo o experimento o estresse foi realizado diariamente das 8:30 às 10:30 e das 16:30 até o dia seguinte (overnight). A cada semana o estresse ocorreu da seguinte forma: dois períodos de privação de alimentos ou de água; dois períodos de inclinação da gaiola a 45⁰; dois períodos de sujidade da gaiola (250ml de água na serragem); dois períodos de luz estroboscópica (2 horas); dois períodos de natação a 4⁰ ou 45⁰; dois períodos de aperto caudal (1min); e dois períodos de nenhum estresse (Figura 4). Todos estes estresses foram aplicados aleatoriamente através de um sorteio de forma que os estresses overnight eram realizados no período da tarde e os demais no período da manhã.

Figura 4 – Ilustração dos diferentes tipos de estresse realizado nos animais



Legenda: a) Inclinação da gaiola à 45°; b) Sujidade da gaiola; c) Luz estroboscópica; d) Aperto caudal; e) natação 4° e a 45°.
Fonte: Elaborada pelo autor.

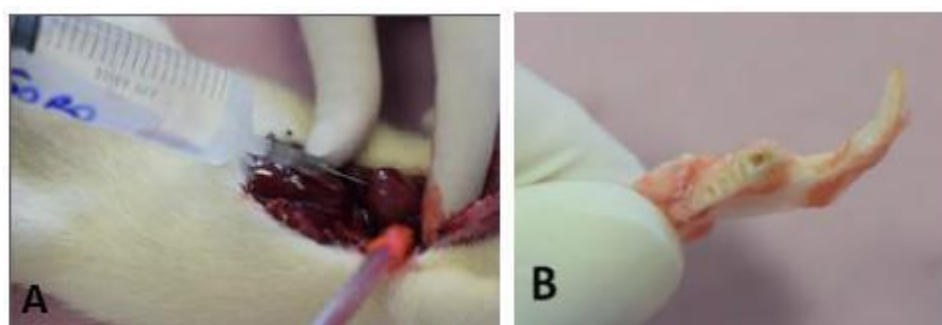
4.4 Eutanásia e coleta das amostras

Para a eutanásia, os animais foram anestesiados com Ketamina (75mg/kg, Vetaset; Fort Dodge Animal Health Ltd, São Paulo, Brazil) e Xilazina (50 mg/kg, Coopazine; Coopers Ltd Brazil, São Paulo, Brazil) por injeção via intramuscular e eutanasiados de acordo com o grupo após 14, 21 e 28 da indução da lesão periapical.

A coleta de amostras sanguíneas foi realizada (Labor Import, Osasco, SP – Brasil) por meio de punção cardíaca (Figura 5A). Após a coleta do sangue por meio de tubo coletor a vácuo, esse sangue ficou em repouso por 30 minutos e em seguida foi centrifugado por 400 rpm por 5 minutos, após, foi coletado o soro sanguíneo através de uma micropipeta de 1 ml e este foi armazenado em microtubos a -80°C até o momento da sua utilização.

Realizou-se na sequência a decapitação dos animais e a remoção das hemimandíbulas esquerdas (N=8), que foram dissecadas e fixadas em formol a 10% (Figura 5B).

Figura 5 – Procedimentos realizados no momento da eutanásia



Legenda: a) Coleta do soro sanguíneo por meio de um tubo coletor a vácuo; b) Hemimandíbula após remoção e dissecação.
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Análise da indução do estresse pelo teste de radioimunoensaio

Amostras de sangue foram colhidas até 10:00hs no dia da eutanásia. O soro foi recolhido e armazenados a -80°C (Figura 6). Os kits de corticosterona para ratos e camundongos (ICN Biomedical, Costa Mesa, CA) foi utilizado para determinar os níveis de corticosterona no soro. O material coletado foi encaminhado para o Laboratório de Endocrinologia Animal da Universidade Estadual Paulista- UNESP câmpus de Araçatuba. Os níveis de corticosterona de cada animal foi determinado a partir de uma curva padrão e expresso em ng/ml.

Figura 6 – Amostra de sangue dos ratos realizada antes da decapitação



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.6 Análise microtomográfica da estrutura óssea periapical por microtomografia computadorizada

Após a fixação, todas as hemimandíbulas de cada grupo experimental foram preparadas para escaneamento microtomográfico. As peças foram posicionadas e fixadas no porta-amostra apropriado para o equipamento, presas no meio de um isopor cilíndrico bipartido envoltas por papel absorvente úmido, possibilitando a estabilização a fim de prevenir qualquer tipo de movimentação durante o

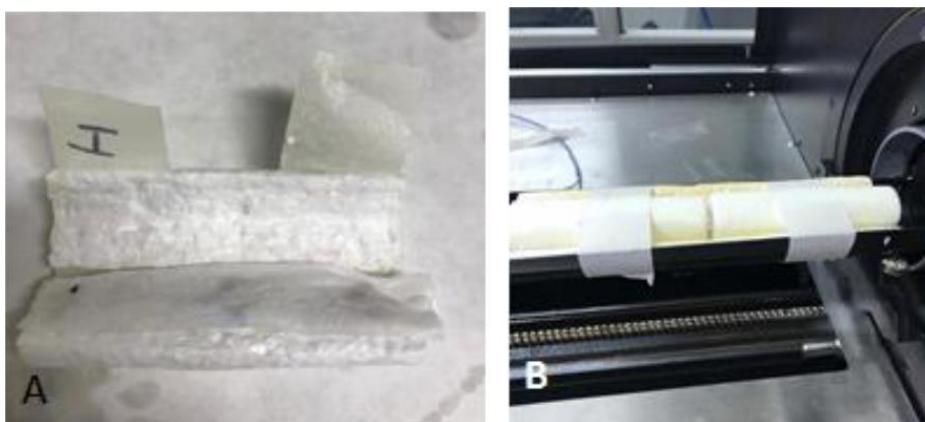
escaneamento e mantendo a umidade da peça (Figura 8). Para realização da análise microtomográfica foi utilizado um aparelho modelo 1176 da fabricante SkyScan® (SkyScan 1176 in vivo, Skyscan, Kontich, Belgium). (Figura 7) O escaneamento das amostras foi padronizado com um tamanho de voxel isotrópico de 18µm, 50kV, 500µA, em 180°, ângulo de rotação de 0.0120 e filtro de A1 0,5mm com tempo de exposição de 380 milissegundos ou seja 0,5 s, utilizando um filtro de alumínio de 0.5m de espessura. O programa NRECON® v 1.6.3.3 em cerca de 395 fatias de acordo com os parâmetros anatômicos adotados foi utilizado para reconstrução das imagens (Figura 9A). O programa DataViewer® foi utilizado para visualização e avaliação em 2D (medidas lineares) dos eixos sagital, coronal e axial. Para as análises volumétricas foi escolhido um eixo de interesse (sagital) e utilizado um programa específico de análises 3D (CTan®) (figura 9C). O Objetivo das análises volumétricas (3D) foi quantificar o volume do osso alveolar na região do periápice, para tanto, foi escolhido como ponto central corte (slice) onde a lesão periapical aparece em sua maior extensão. O ponto final da seleção foi determinado em 50 slices no sentido vestibulo lingual e 50 slices no sentido língua vestibular, totalizando uma região de interesse composta por 101 slices em todas as amostras. Essa região corresponde a área de interesse (ROI) onde foi quantificada a reabsorção óssea periapical. Foi utilizado o "ROI" personalizado, permitindo um delineamento manual da lesão periapical e fornecendo um tamanho mais preciso do volume de reabsorção óssea. Todos os cálculos foram realizados sobre a região de interesses. Selecionados os parâmetros de interesse, os resultados apareceram em uma tabela contendo cada parâmetro calculado pelo CTAnalyser e sua respectiva unidade de medida. O volume tecidual (TV), volume ósseo e proporção BV/TV foram quantificados. Todas as medidas foram realizadas por um examinador calibrado que não tinha nenhuma informação de identificação dos grupos avaliados.

Figura 7 – Microtomógrafo da SkyScan 1176



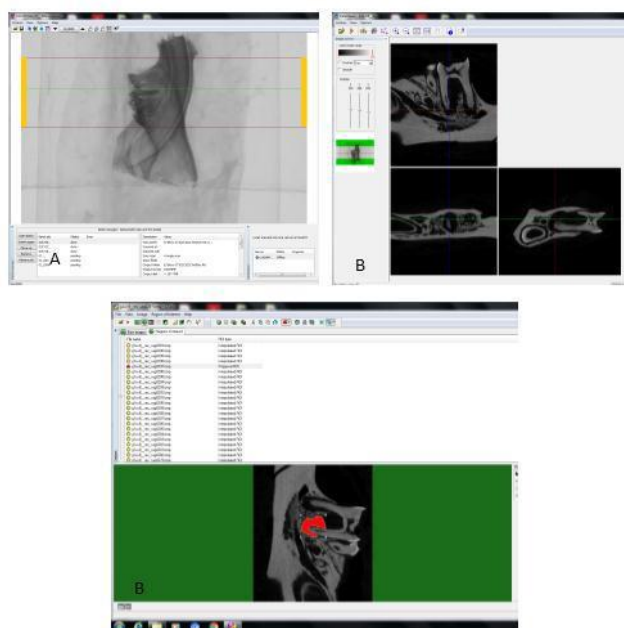
Fonte: www.accela.eu/bruker-biospin/skyscan-1176.

Figura 8 – Preparo das peças para escaneamento no microtomógrafo



Legenda: a) Posicionamento das peças em dispositivo de isopor envoltas em papel absorvente úmidas; b) Dispositivo posicionado no microtomógrafo.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 9 – Análise microtomográfica das lesões periapicais



Legenda: (A): Parâmetros adotados para análise por micro-CT a partir do programa NRECON®; (B) Avaliação em 2D das medidas lineares DataViewer®; (C) Análise volumétrica em 3D no programa CTan®.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.7 Análise Histológica da região periapical

As hemi-mandíbulas esquerdas de cada grupo foram desmineralizadas em solução de EDTA (etilenodinitrilotetracético – TITRIPLEX III- Merck) por 7 meses. Após desmineralizadas, as peças foram lavadas abundantemente em água corrente e submetidas à técnica histológica de rotina para inclusão em parafina. Foram feitos cortes semiseriados, de forma que o primeiro corte a ser considerado para análise fosse o primeiro que aparecesse as duas raízes (mesial e distal). O corte foi feito paralelo as raízes e montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina.

Para análise da extensão da lesão periapical, os cortes foram fotografados com microscópio de Luz Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss do Brasil), com câmera digital acoplada Canon, modelo Power Shot A640. Foram obtidas uma imagem digital (formato JPEG) em aumento de 4x (1 imagem) e 40x (10 imagens). Posteriormente, as lâminas foram avaliadas morfológica e quantitativamente.

quanto à presença da lesão periapical e extensão da lesão periapical. As análises foram realizadas por um examinador calibrado utilizando o software ImageJ.

Foi delineada uma tabela para análise histológica e histomorfométrica que foi preenchida com os dados de cada espécime analisado.

Para análise histomorfométrica verificou-se o infiltrado inflamatório, sua intensidade e extensão (Cintra et al., 2014). O número médio de células inflamatórias foi avaliado por área e extensão ao redor do forame apical.

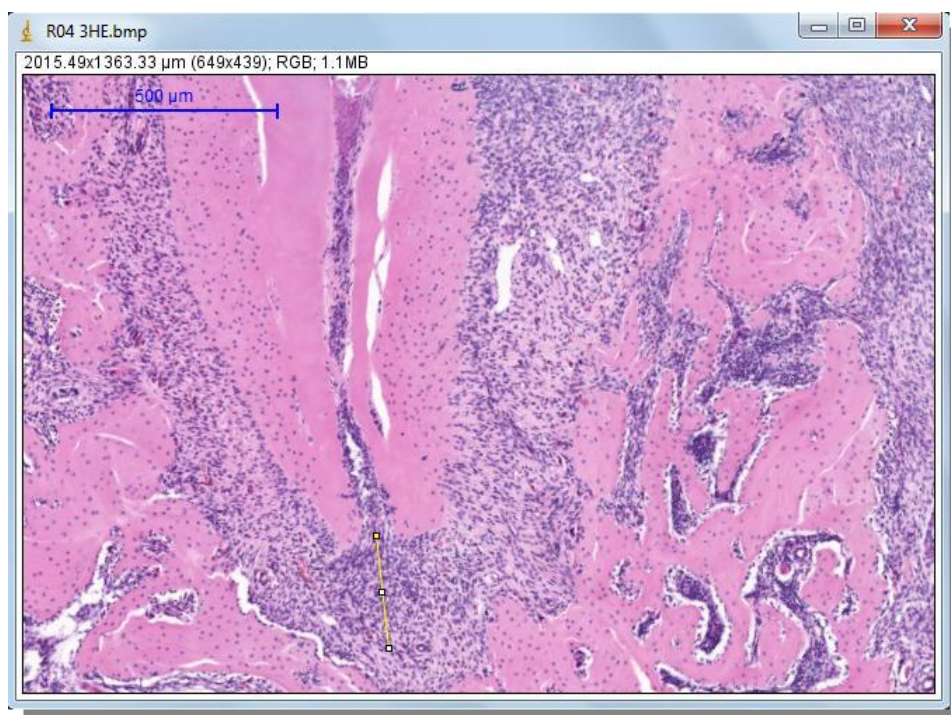
O número de células inflamatórias foi calculado por meio da média de 10 áreas separadas (ampliação x40) para cada grupo.

A intensidade do infiltrado inflamatório foi classificada através de scores sendo: score 1 (0 a 25 células inflamatórias); score 2 (25 a 50 células inflamatórias); score 3 (50 a 75 células inflamatórias); score 4 (acima de 75 células inflamatórias).

A extensão do infiltrado inflamatório foi também classificada através de scores sendo: score 1 (0 a poucas células inflamatórias, sendo menor que 300mm de comprimento), score 2 (células que ocupam 300mm de comprimento), score 3 (células que ocupam até um comprimento de 600 mm) e score 4 (células que ocupam um comprimento > 600mm) (Figura 10).

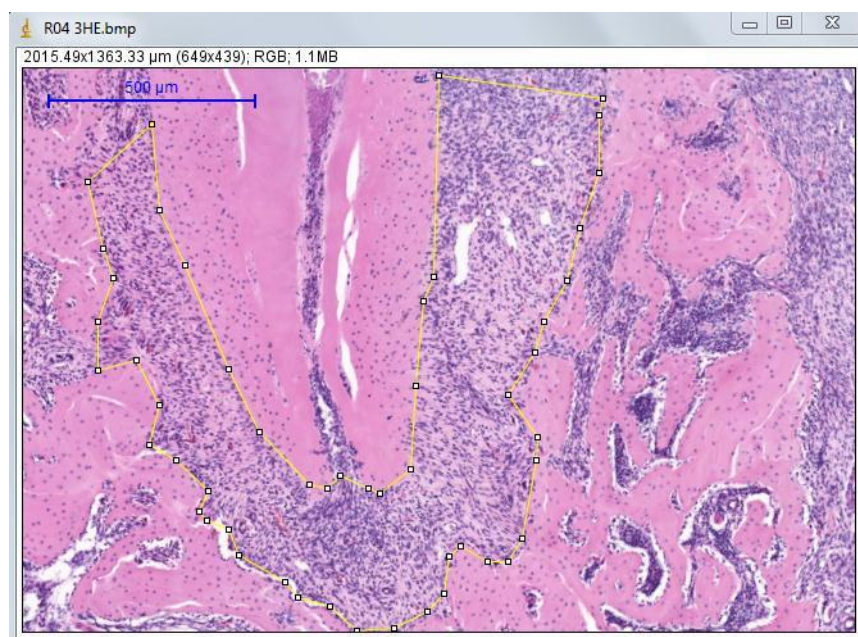
A área de lesão periapical associada ao terço apical da raiz distal do primeiro molar mandibular foi medida pelo software Image J (Domínio Público) (Figura 11). Foi realizado o delineamento manual do limite da lesão, considerando a superfície externa do cimento, o ligamento periodontal e a superfície externa do osso alveolar que foi expresso em mm².

Figura 10 – Avaliação da extensão do infiltrado inflamatório



Legenda: Medida da extensão do infiltrado inflamatório através de uma linha com início a partir do forame apical da raiz distal. Cada amostra recebeu um score como mencionado acima.
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 11 – Avaliação da extensão da lesão periapical



Legenda: Delimitação das bordas da lesão a partir do terço apical, contornando a superfície externa do cimento e interna do osso alveolar.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.8 Análise imuno-histoquímica da expressão de RANKL e OPG

Para as reações imuno-histoquímicas, os cortes histológicos, do material embocado em parafina, sobre lâminas silanizadas, foram desparafinizadas em xilol, reidratadas em série decrescente de etanol, e seguiram os seguintes passos:

- a) Eliminação de pigmentos formólicos em hidróxido de amônia a 10% em etanol 95^o por 10 minutos;
- b) Lavagem em água corrente por 10 minutos seguida por banho em água destilada;
- c) Bloqueio da peroxidase endógena tecidual com peróxido de hidrogênio a 6% e metanol 1:1, duas trocas de 5 minutos;
- d) Lavagem em água corrente por 10 minutos seguida de água destilada e incubação por duas vezes em tampão Tris (pH 7,4), durante 5 minutos cada;
- e) Recuperação antigênica conforme estudo piloto que foi realizado na padronização;
- f) Bloqueio dos anticorpos inespecíficos com BSA 1% por uma hora em câmara úmida, à temperatura ambiente;
- g) Incubação com o anticorpo primário com diluições que foram definidas nas reações de padronização de cada anticorpo.

Foi realizada a análise imuno-histoquímica de RANK-L e OPG (anti-RANKL-7628, e anti-OPG-sc 1183, Santa Cruz Biotecnologia). Seções sem a adição de anticorpos primários foram usadas como controles negativos. Após a incubação, as seções foram lavadas com TRIS e tratadas com complexo de detecção (Envision DAKO) durante 30 min. As seções foram então lavadas com tampão Tris (pH 7,4). A reação foi revelada pela incubação por 5 min com diaminobenzidina (DAB DAKO).

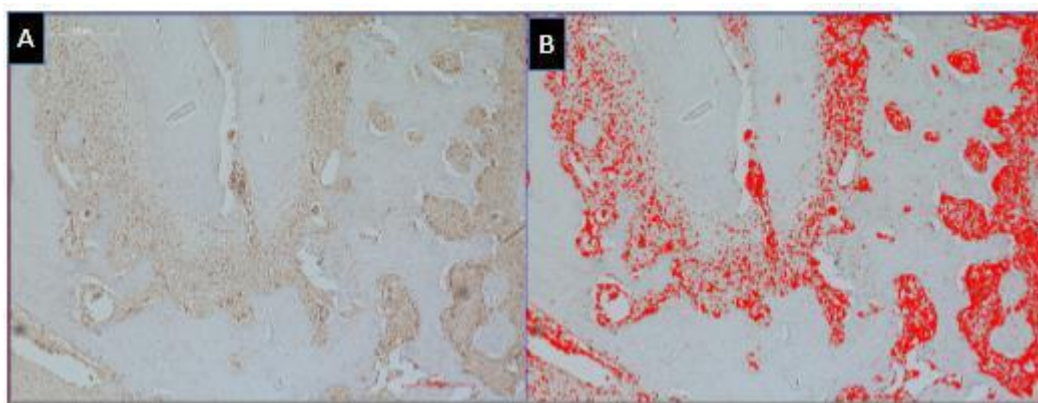
Ocorreu então lavagem em água corrente e água destilada.

Posteriormente, foi realizada a contra-coloração dos cortes com hematoxilina de Mayer, desidratação em etanol, clareamento em xilol e montagem das lâminas.

O controle negativo foi realizado com a incubação dos cortes em solução tampão, sem a utilização de anticorpo primário.

A quantificação dos anticorpos foi realizada utilizando a ferramenta de análise automática do software Leica Microsystems Software (Leica, Wetzlar, Germany).. Foi aplicada a calibração em μm e o threshold definido para avaliar a marcação acastanhada da imunohistoquímica. A análise automática determinou a área em μm^2 de expressão de RANKL e OPG (Figura 12).

Figura 12- Software Leica Microsystems Software (Leica, Wetzlar, Germany).para análise automática da quantificação de anticorpos



Legenda: (A) Imagem representando a marcação imunohistoquímica com hematoxilina (B) Marcação em vermelho de RANKL feita pelo Leica Microsystems Software (Leica, Wetzlar, Germany).
Fonte: Elaborada pelo autor

4.9 Análise estatística

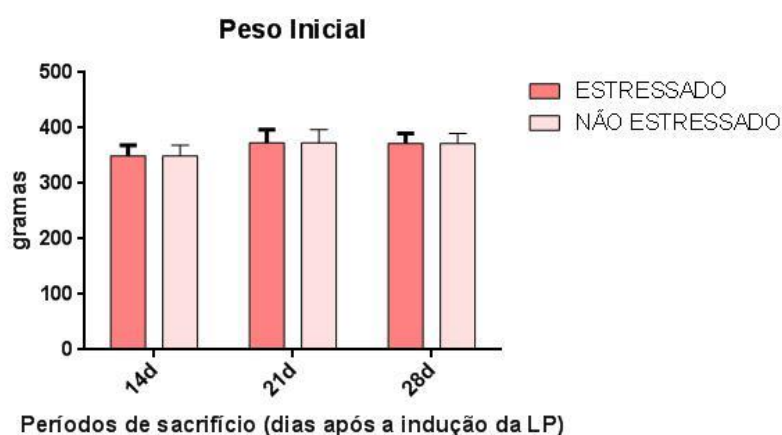
Os dados obtidos nos testes paramétricos foram registrados e apresentados através da média e desvio padrão observados. Todas as análises foram avaliados pelo teste ANOVA dois fatores ($p < 0,05$). Todos os testes estatísticos foram realizados no software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., California, EUA).

5 RESULTADO

5.1 Peso dos animais

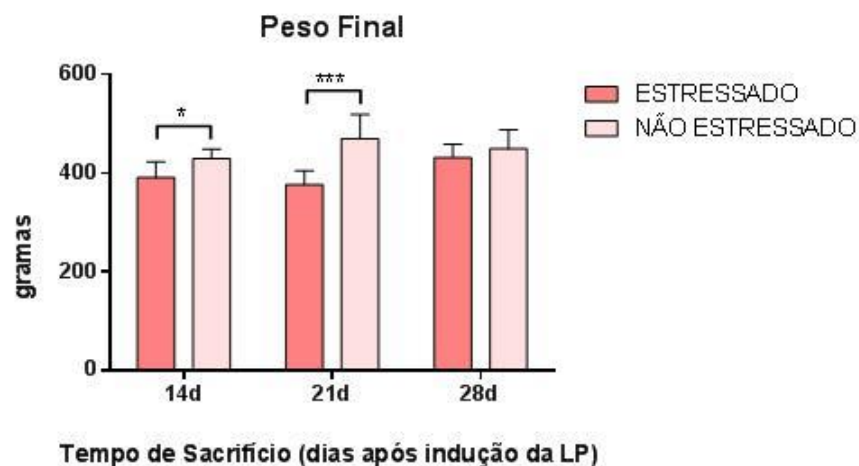
Todos os animais sobreviveram durante todo o período do experimento. No início do experimento não houve diferença estatística entre o peso dos animais nos grupos E e SE (Figura 13). Durante o experimento todos os animais dos grupos E e SE aumentaram de peso, e não houve diferença estatística entre eles. Ao final do experimento comparando-se os grupos com estresse (E) e sem estresse (SE) nos períodos de 14 e 21 dias verificou-se ganho de peso maior nos animais que não receberam estresse (SE) ($p>0.05$). (Figura 14).

Figura 13 – Peso inicial dos animais



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14 – Peso final dos animais



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2 Níveis séricos de corticosterona

Em relação aos níveis séricos de corticosterona, todas as amostras foram avaliadas em duplicata e o valor médio das amostras foi considerado para análise estatística. Os níveis séricos de corticosterona foram significativamente maior nos animais estressados no período de 21 dias. Já no período de 14 e 28 dias observou-se um nível sérico muito semelhante nos animais estressados e não estressados (Tabela 1 e Figura 15).

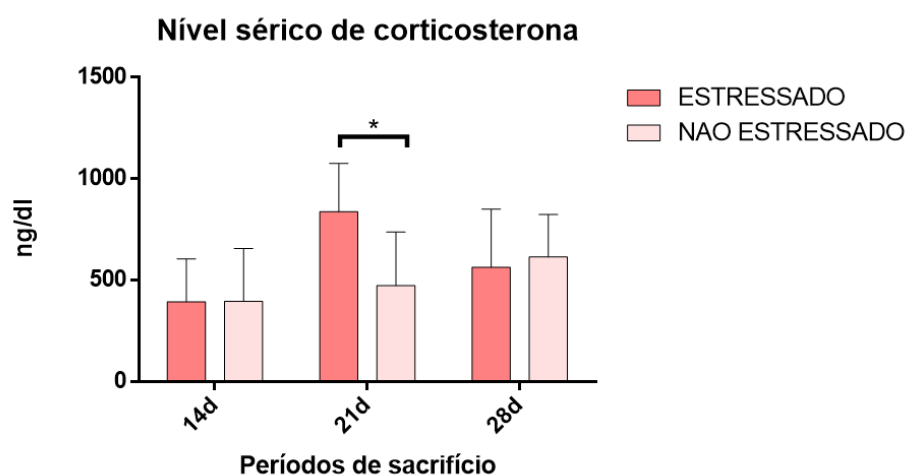
Tabela 1 – Média e Desvio Padrão (DP) dos Níveis de Corticosterona (ng/dL) dos animais de todos os grupos avaliados

Períodos de Eutanásia	Níveis de Corticosterona (ng/mL) $\pm$ DP	
	Estressados	Sem estresse
14	393.8 $\pm$ 211.5 Aa	396.8 $\pm$ 259.6 Aa
21	837.8 $\pm$ 238.8 Ab	549.5 $\pm$ 312.2 Ba
28	564 $\pm$ 286.9 Aab	616 $\pm$ 208.9 Aa

*Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos dentro do mesmo período de eutanásia. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os diferentes períodos de eutanásia dentro do mesmo grupo.

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 15 – Nível sérico de corticosterona sanguínea



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Análise Microtomográfica

Nenhuma diferença estatística foi observada em relação ao volume da lesão periapical entre os grupos estressados (E) e não estressados (SE) nos períodos de 14 e 28 dias após a indução da lesão. No período de 21 dias após a indução da lesão, o volume da lesão foi significativamente maior no grupo Estressado (E) confirmado por análise detalhada do Volume ósseo/Volume Tecidual da área da lesão periapical. (Tabela 2 e Figura 16)

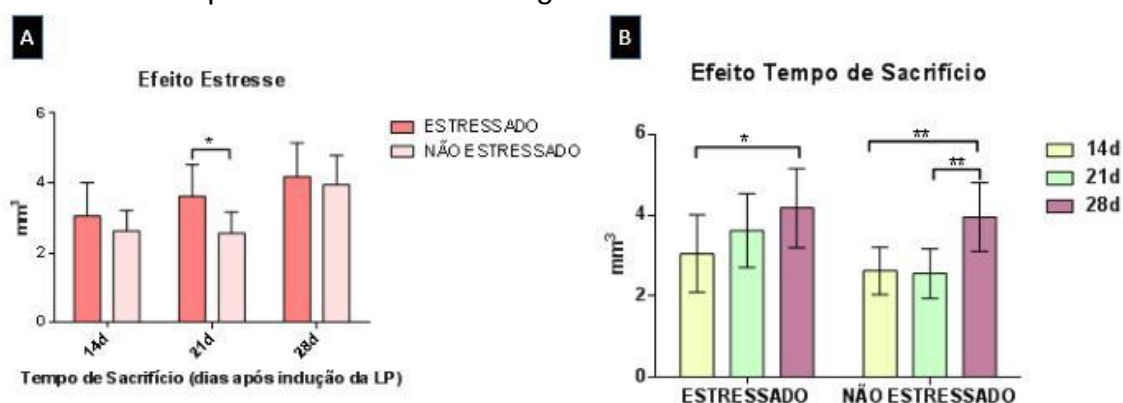
Tabela 2 - Média e Desvio Padrão (DP) do volume tecidual da lesão (mm^3) correspondente a cada período de todos os grupos avaliados

Períodos de Eutanásia	Volume da lesão (mm^3) $\pm$ DP	
	Estressados	Sem estresse
14	3.08 $\pm$ 0.95 Aa	2.62 $\pm$ 0.57 Aa
21	3.62 $\pm$ 0.91 Aab	2.56 $\pm$ 0.61 Ba
28	4.17 $\pm$ 0.17 Ab	3.95 $\pm$ 0.84 Ab

*Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos dentro do mesmo período de eutanásia. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os diferentes períodos de eutanásia dentro do mesmo grupo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 16 – Volume da lesão periapical no terço apical da raiz distal do primeiro molar inferior medida pela análise microtomográfica

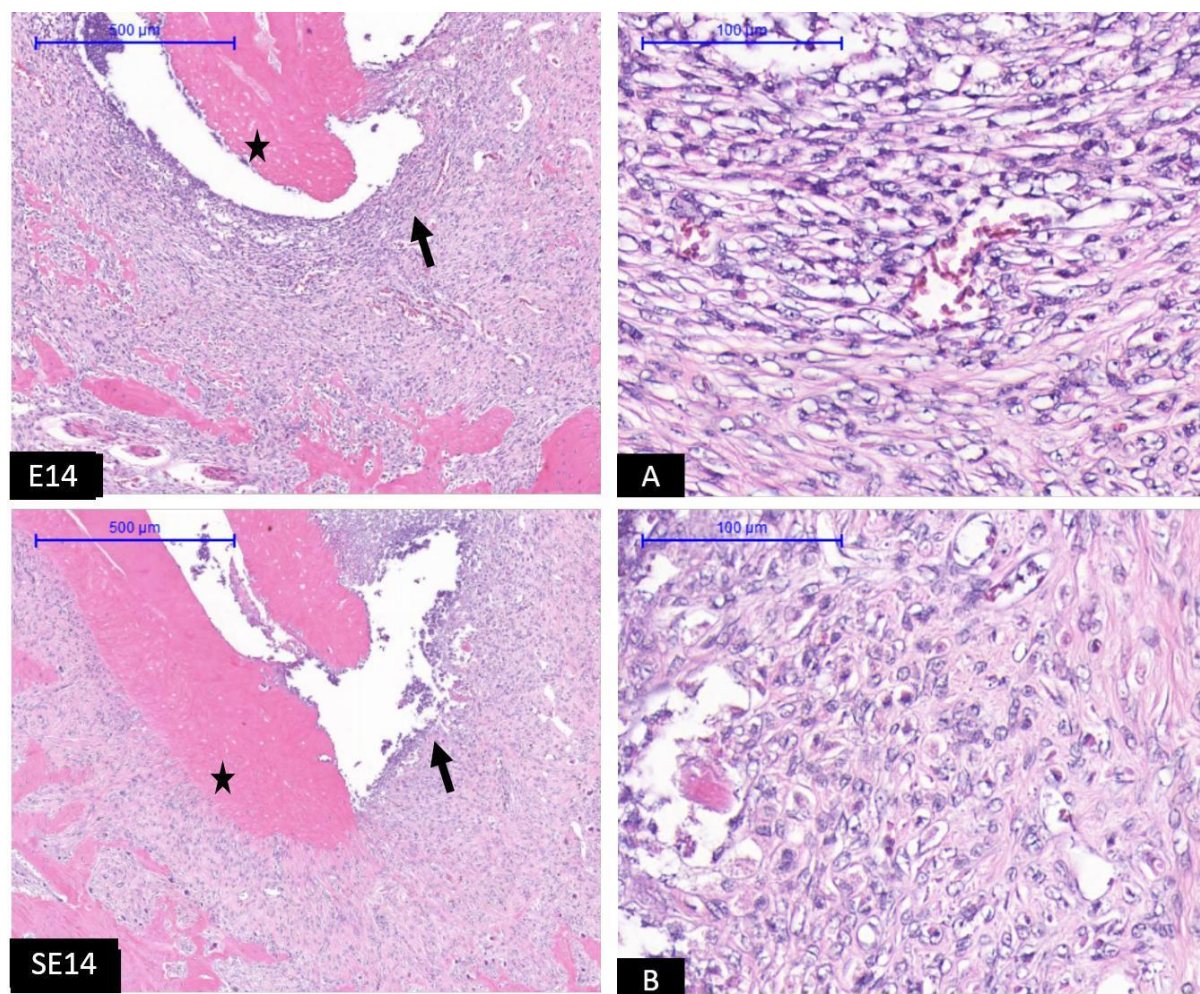


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 Análise Histomorfométrica

As evidências do processo inflamatório foram observadas em todos os grupos; embora sem diferença estatística observa-se que nos grupos estressados este processo inflamatório foi mais intenso (Figura 17-19). Em relação a extensão do infiltrado inflamatório, também não houve diferença estatística entre os grupos E e SE nos diferentes tempos da lesão. As lesões periapicais apresentaram característica de granuloma periapical e histometricamente, observou-se extensão da lesão periapical significativamente maior nos animais estressados no período de 21 dias do que dos animais não estressados.

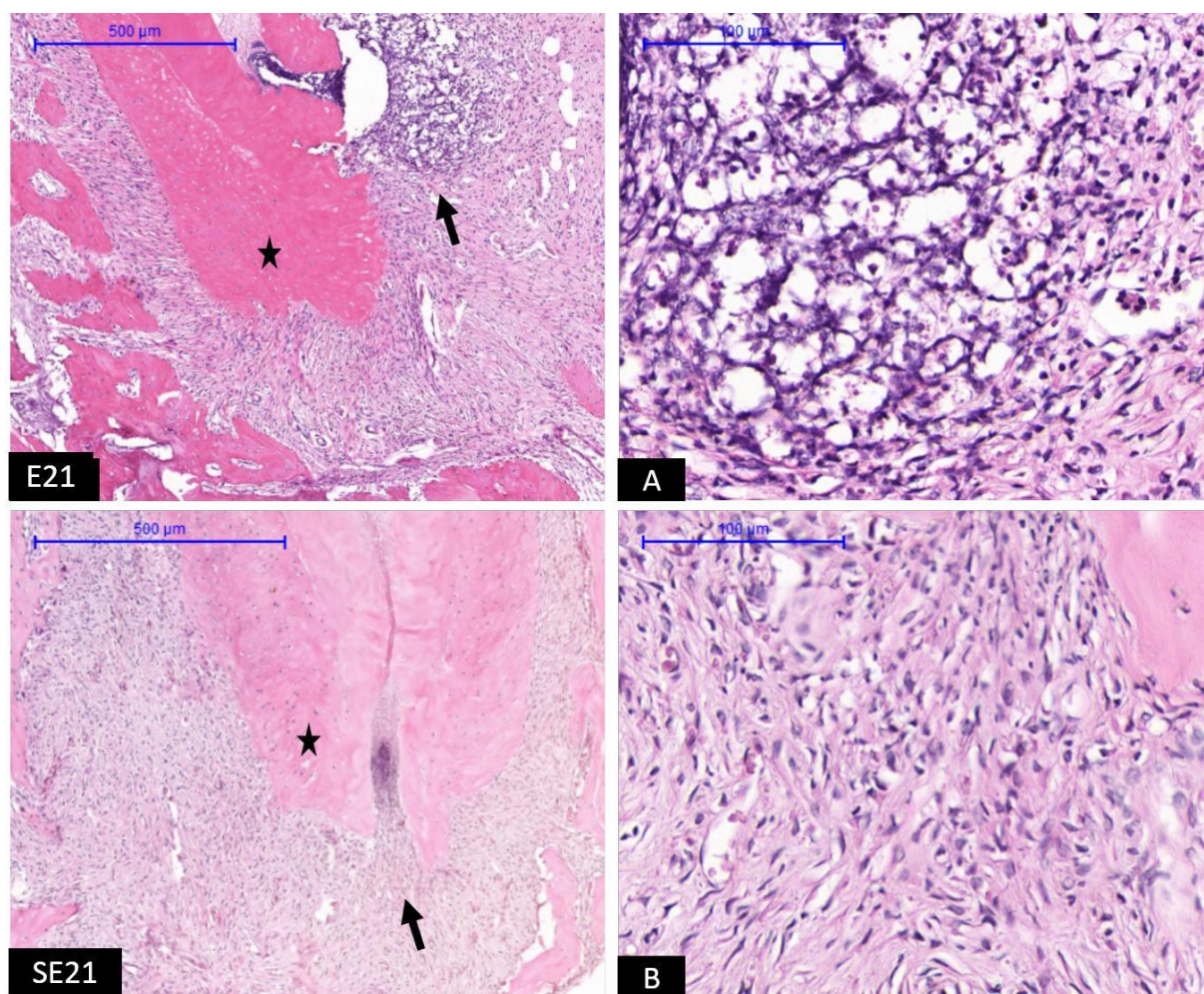
Figura 17 – Aspectos histológicos das lesões periapical após 14 dias da exposição pulpar a cavidade oral. Infiltrado inflamatório crônico moderado nos grupos: E14 (4x)(A) observa-se em maior aumento do infiltrado inflamatório (40x) , SE14 (4x)(B) observa-se em maior aumento do infiltrado inflamatório (40x). Coloração com hematoxilina e eosina, no Pannoramic Viewer Software



Legenda: A estrela representa região de cemento do primeiro molar inferior esquerdo, a seta aponta a região do infiltrado inflamatório próxima ao forame.

Fonte: Elaborada pelo autor.

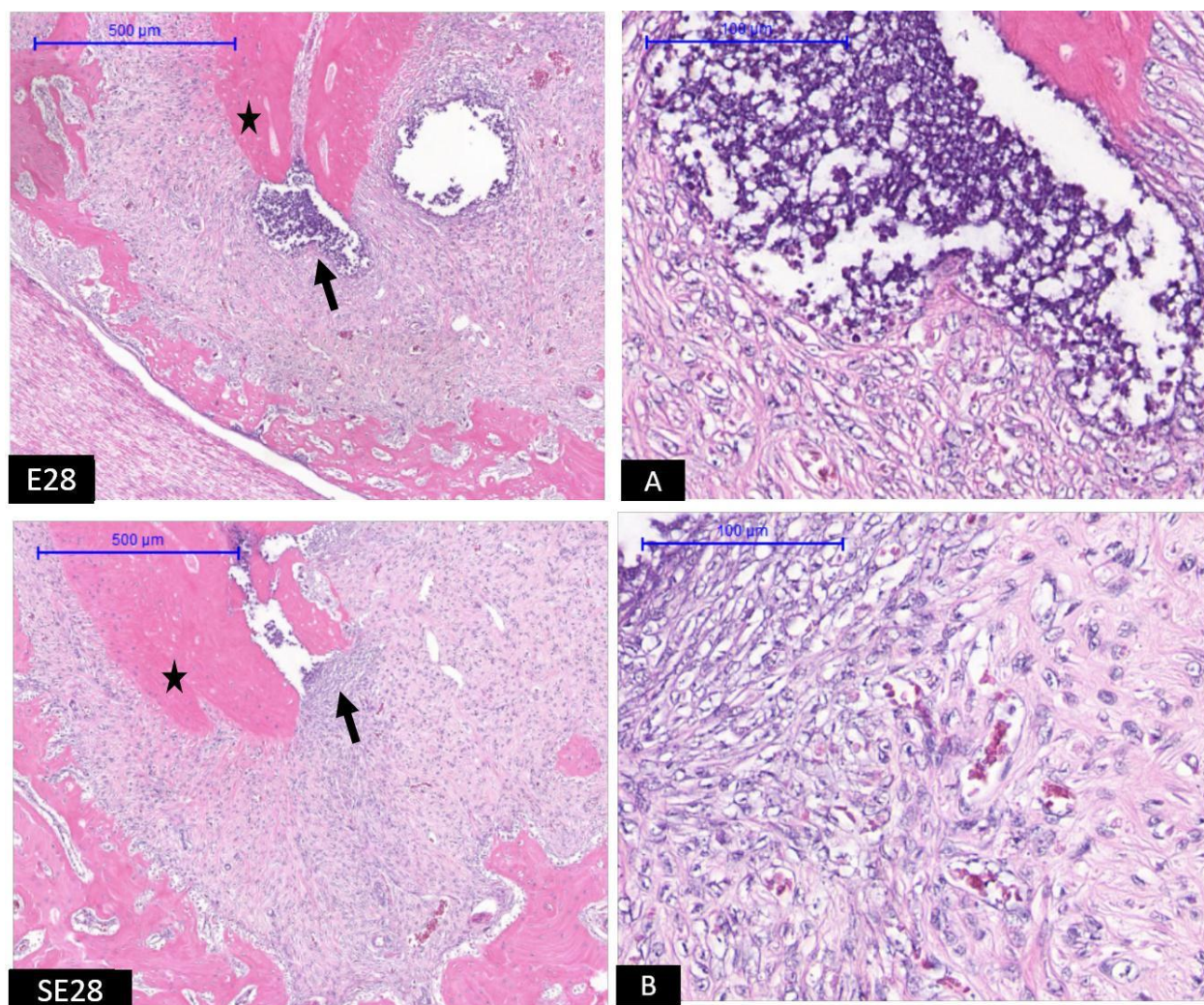
Figura 18 – Aspectos histológicos das lesões periapical após 21 dias da exposição pulpar a cavidade oral. Infiltrado inflamatório crônico moderado nos grupos: E21 (4x)(A) observa-se em maior aumento do infiltrado inflamatório (40x) , SE21 (4x)(B) observa-se em maior aumento do infiltrado inflamatório (40x). Coloração com hematoxilina e eosina, no Pannoramic Viewer Software



Legenda: A estrela representa região de cimento do primeiro molar inferior esquerdo, a seta aponta a região do infiltrado inflamatório próxima ao forame.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 19 – Aspectos histológicos das lesões periapical após 28 dias da exposição pulpar a cavidade oral. Infiltrado inflamatório crônico moderado nos grupos: E28 (4x)(A) observa-se em maior aumento do infiltrado inflamatório (40x) , SE28 (4x)(B) observa-se em maior aumento do infiltrado inflamatório (40x). Coloração com hematoxilina e eosina, no Pannoramic Viewer Software



Legenda: A estrela representa região de cimento do primeiro molar inferior esquerdo, a seta aponta a região do infiltrado inflamatório próxima ao forame.

Fonte: Elaborada pelo autor.

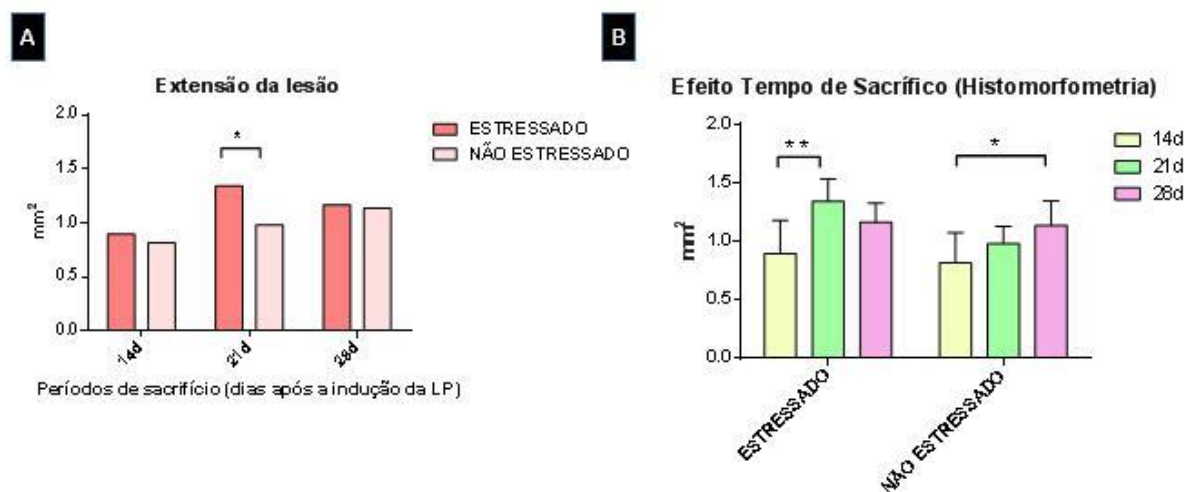
Tabela 3 – Scores, Mediana, Média, e Desvio Padrão (DP) dos achados histológicos, referente a lesão periapical de todos os grupos

Parâmetros Histológicos	Scores	Grupos					
		E14	SE14	E21	SE21	E28	SE28
Infiltrado Inflamatório	1	1/8	2/8	1/8	1/8	0/8	0/8
	2	2/8	5/8	2/8	5/8	3/8	6/8
	3	5/8	1/8	3/8	2/8	5/8	2/8
	4	0/8	0/8	2/8	0/8	0/8	0/8
	Mediana	3 ^a	2 ^a	3 ^a	2 ^a	3 ^a	2 ^a
Extensão do infiltrado inflamatório	1	2/8	3/8	3/8	2/8	1/8	2/8
	2	5/8	5/8	4/8	6/8	7/8	6/8
	3	1/8	0/8	1/8	0/8	0/8	0/8
	4	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	Mediana	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a
Área de Lesão Periapical (mm ²)	Média ± DP	0.89 ± 0.28 ^a	0.81 ± 0.25 ^a	1.34 ± 0.18 ^b	0.98 ± 0.14 ^a	1.16 ± 0.16 ^a	1.13 ± 0.21 ^a

*Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas, P < .05.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 — Representação gráfica da extensão da área da lesão periapical (mm^2) da raiz distal do primeiro molar inferior

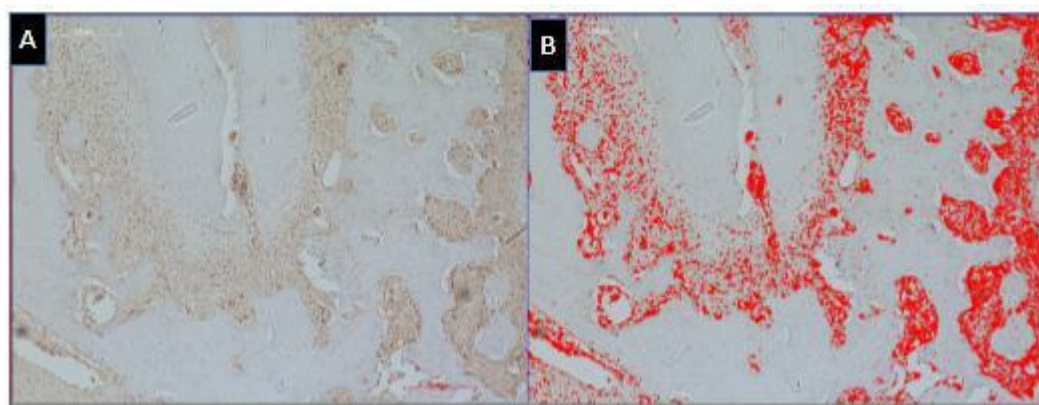


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5 Análise Imunohistoquímica de RANKL/OPG

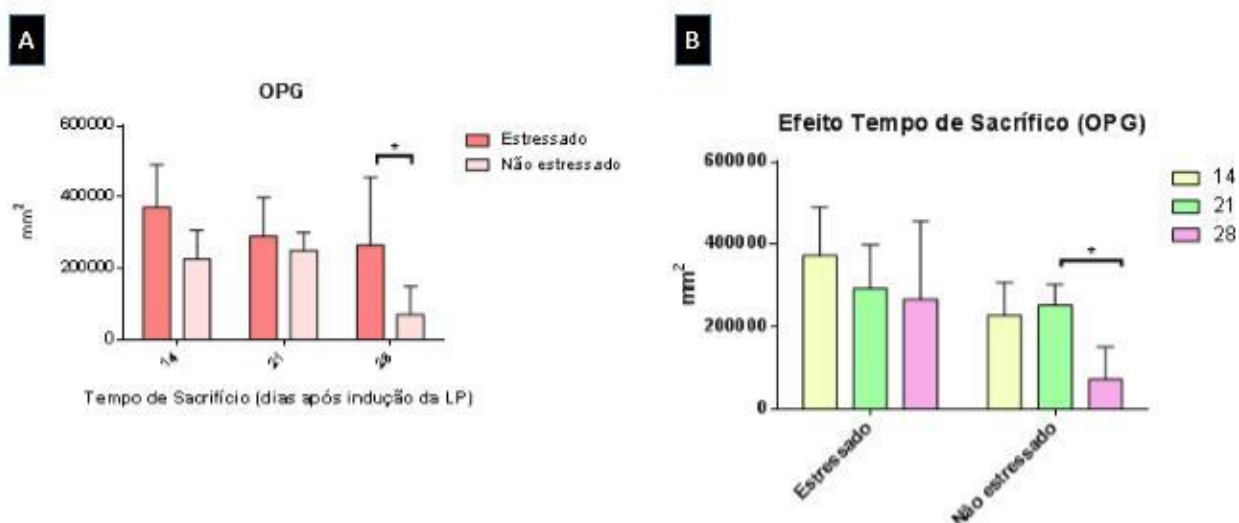
A expressão de OPG e RANKL está ilustrada nas Figuras 22 e Figura 23, respectivamente. Nos animais estressados a expressão de OPG foi maior nos animais estressados do que nos não estressados no período de 28 dias (Figura 22A) e OPG foi maior nos animais não estressados do período de 21 do que no grupo de 28 dias (Figura 22B). Em relação a expressão de RANKL não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 23).

Figura 21- (A) Imagem representando a marcação imunohistoquímica com hematoxilina; (B) Marcação em vermelho de OPG feita pelo Leica Microsystems Software (Leica, Wetzlar, Germany)



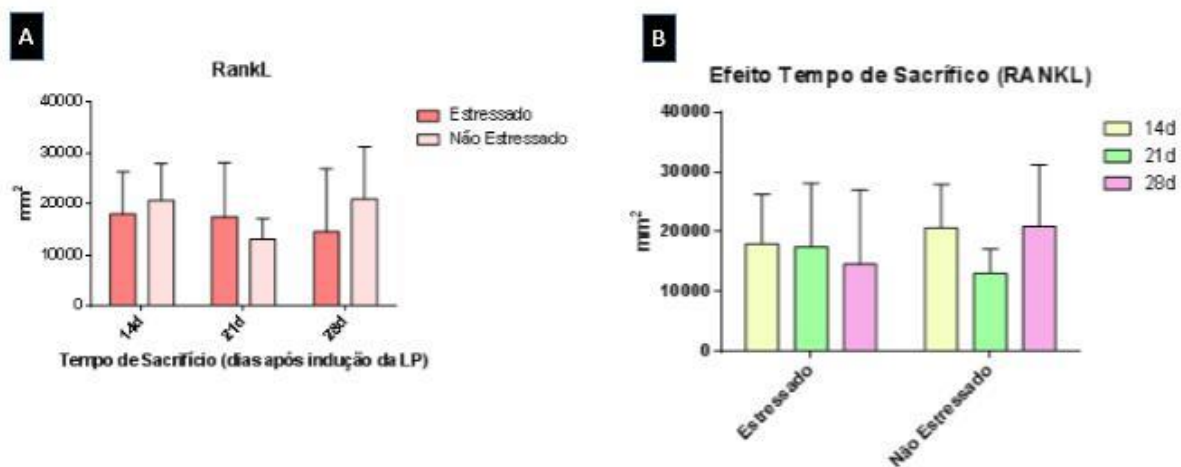
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 22- Expressão de OPG na região periapical em μm^2



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 23 - Expressão de RANKL na região periapical em μm^2



Fonte: Elaborada pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Muito tem sido estudado sobre fatores psicológicos e emocionais, como o estresse, a depressão e a ansiedade, cada vez mais presentes na vida moderna. (Peruzzo et al., 2007; Rosania et al., 2009; Dabhar, 2009). A influência do estresse na resposta imune do hospedeiro é bem estabelecida na literatura. Estudos na área demonstraram que o estresse crônico estimula a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e também do Sistema Nervoso Simpático, que favorecem a liberação do hormônio cortisol e da adrenalina respectivamente, levando a inúmeros prejuízos ao organismo (Breivik et al., 2006; Katori et al., 2012; Gaspersic et al., 2002).

Na área da odontologia o estresse também vem sendo amplamente estudado, principalmente na área da periodontia. Diversos estudos tem correlacionado os efeitos do estresse na progressão da perda óssea periodontal (Lu et al., 2014; Genco et al., 1999; Rosania et al., 2009). Entretanto, na endodontia não tem sido explorado este assunto. Sabe-se que há uma semelhança na origem e composição dos microorganismos presentes tanto na doença periodontal como na periodontite apical (Siqueira, Rôças, 2014) e acredita-se que as mesmas doenças sistêmicas associadas a periodontite podem estar associadas a periodontite apical (Segura- Egea et al., 2015). Gomes et al. em 2019, relacionam a influência do estresse com a progressão da lesão periapical, por meio de análise radiográfica. No presente estudo podemos observar com maior clareza esta relação bem como o melhor tempo para análise desta correlação.

Neste estudo, o modelo de indução da lesão periapical foi através da exposição da cavidade pulpar ao meio bucal, este protocolo já vem sendo estudado e mostra que após 15 dias a polpa já se encontra necrosada e a lesão já é visível radiograficamente (Takehashi et al., 1965; Stashenko et al., 1992). Pode-se comprovar a eficácia desse método de indução da lesão periapical, visto que a lesão já estava formada no décimo quarto dia após a indução, tanto pelas análises microtomográficas como pelas análises histológicas.

A literatura mostra modelos animais de indução de estresse, como os modelos não condicionados e os modelos condicionados. O primeiro consiste na

exposição do animal a um ambiente novo, evocando medo e curiosidade, como labirintos, que demonstraram sinais de estresse através do aumento da defecação e pelos níveis aumentados de corticosterona (Pellow S, File SE.1986). Já o segundo, consiste em um estresse condicionado como exemplo uma exposição ao choque; no momento da reexposição ocorrerá ativação de uma resposta condicionada ao medo, levando ao quadro de estresse crônico. Outro modelo bem estabelecido na literatura o modelo de estresse crônico imprevisível, que é amplamente utilizado para induzir mudança de comportamento nos roedores e consiste em apresentar de forma aleatória os diferentes tipos de estímulos estressores por um período de 2 a 5 semanas. Após esse período observa-se atividade aumentada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Willner et al., 1990). Tal metodologia é amplamente validada e utilizada visto que a aleatoriedade dos estímulos evita a adaptação dos animais ao estresse crônico (Campos et al., 2013).

Neste estudo, o protocolo de estresse estabelecido foi o protocolo baseado no estudo de Willner et al. (1992), com algumas modificações, no qual foi observado que o período de 32 dias de indução do estresse é o suficiente para garantir um estresse crônico eficiente do animal. Porém, um estudo recente, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, no qual o estresse iniciou-se junto a indução da lesão e permaneceu por mais 32 dias, não mostrou alteração na perda óssea em lesões periapicais, o que nos leva a pensar que provavelmente durante o momento da indução da lesão seria fundamental que o animal já estivesse sob um quadro de estresse crônico. Portanto, no presente estudo o protocolo de estresse teve início 21 dias antes da indução da lesão periapical.

O método escolhido para confirmação do estresse crônico nos animais foi o peso e os níveis séricos de corticosterona. Um estudo realizado por Pellow S et al. (1986) também já mencionava o nível de corticosterona aumentado como fator representativo do estresse. As alterações comportamentais de ansiedade, depressão e estresse estão acompanhadas da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, que leva a uma alteração hormonal, aumentando o nível da liberação de cortisol (Heim C, Nemeroff C.B. 1999). Neste estudo, observou-se aumento significativo nos níveis sanguíneos de corticosterona nos animais estressados no período de 21 dias. A diferença no ganho de peso dos animais, também é um critério significativo para avaliar se o estresse foi eficaz. Um estudo realizado por

Marin et al. em 2007 observou-se que o ganho de peso em animais estressados foi menor que nos não estressados. Nosso estudo também verificou nos grupos estressados de 14 e 21 de indução da lesão apresentaram menor ganho de peso do que animais não estressados (Simch et al., 2008; Soletti et al., 2009).

Ao avaliar o efeito do estresse na lesão periapical verificou-se histologicamente a presença de um infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear caracterizado uma inflamação crônica (Scales, Huffnagle, 2013). Através das imagens histológicas foi observado um infiltrado inflamatório presente em todos os grupos. Tanto a intensidade como a extensão do infiltrado inflamatório foram avaliados por scores, para que fosse aplicada a análise estatística. A utilização de scores para avaliação histológica é amplamente utilizada nos estudos e tem mostrado uma excelente aplicabilidade (Cintra et al., 2014). Neste estudo, apesar do aumento da lesão periapical nos grupos estressados, não houve diferença estatística entre a quantidade de células inflamatórias na região periapical, concordando com estudos prévios (Gomes et al., 2019). Na área da periodontia, estudos também mostraram não haver diferença no perfil de células inflamatórias em lesões periodontais em ratos estressados cronicamente (Campos et al. 2013). Em relação a extensão da lesão, observou-se maior área de lesão periapical nos animais estressados que nos não estressados no período de 21 dias, mostrando que neste período pode ser o melhor período para análise desta natureza.

Uma vez que a análise histológica permite avaliar em 2D e os cortes histológicos serem semi-seriado com espessura de 5 micrometros, utilizou-se no presente estudo a análise microtomográfica como forma de complementar a análise histológica, visto que de Oliveira et al. (2015) observou fraca correlação entre a análise histológica e a análise microtomográfica, possivelmente devido a limitação da análise histológica. Porém, neste trabalho observou-se resultados semelhantes entre a análise histológica e a microtomográfica, visto que o volume da lesão periapical foi maior nos animais estressados que nos não estressados no período de 21 dias.

Neste trabalho foi realizada a eutanásia em diferentes períodos (14, 21 e 28 dias após a indução da lesão periapical) com a finalidade de avaliar o melhor período para análise do efeito do estresse na progressão da lesão periapical. A partir dos resultados verificou-se que no período de 14 dias os animais não

apresentavam diferença estatística no nível de corticosterona sérico entre os animais estressados e não estressados, porém ocorre menor ganho de peso menor nos animais estressados, sendo este um indicativo de estresse. No período de 21 dias, o nível de corticosterona foi significativamente maior nos animais estressados do que nos não estressados, além disso, houve menor ganho de peso nos animais estressados, comprovando que neste período (21 dias) os indicadores de estresse estavam corretos. No período de 28 dias, não houve diferença no nível de corticosterona e nem no peso. Supõe-se que após esse período de estresse os animais entram em estado de adaptação ao estresse.

Uma descoberta importante relacionada a expressão de RANK/RANKL/OPG no metabolismo ósseo revolucionou as pesquisas das últimas décadas (Khosla 2001). A presença da expressão de RANKL e OPG em lesões periapicais é bem estabelecido na literatura. Diversos estudos que analisaram o tecido periapical em animais submetidos ou não a indução da lesão periapical confirmou a relação do aumento da expressão de RANKL e OPG na lesão (Menezes et al., 2008; Vernal et al., 2006). As análises imunohistoquímica mostraram que a imunomarcagem de RANKL e OPG não foram significativamente diferentes entre os animais estressados e não estressados e nem entre os períodos experimentais. Esses resultados são semelhantes ao observado por Bezerra et al. (2005), o qual avaliou a expressão de RANKL/OPG/TRAP na formação da lesão periapical em dois diferentes tipos de camundongos. Os resultados mostraram que houve a imunomarcagem semelhante em todos os grupos, não havendo diferença entre os períodos experimentais. Neste trabalho houve diferença estatística na expressão de OPG no período de 28 dias, porém a partir das demais análises observou-se que os animais não apresentavam mais características de estresse crônico visto que não houve diferença significativa nem no peso e nem nos níveis séricos de corticosterona.

De forma geral, podemos dizer que com a presente pesquisa, verificou-se que o estresse crônico influencia na reabsorção óssea da lesão periapical dos animais submetidos à indução de estresse crônico, mesmo sem alterações significativas na expressão de RANKL e OPG. Os resultados obtidos corroboram com estudos prévios que encontraram influência do estresse na perda óssea em doenças periodontais.

Por fim, observamos que este campo relacionado ao estresse e as suas consequências na progressão da lesão periapical ainda é pouco explorado. Mais estudos são necessários para que haja o completo entendimento de como o estresse afeta o desenvolvimento da lesão periapical.

7 CONCLUSÃO

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

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

¹REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lu H, Xu M, Wang F, Liu S, Gu J, Lin S. Chronic stress enhances progression of periodontitis via alpha 1- adrenergic signaling: a potential target for periodontal disease therapy. *Exp Model Med*. 2014 Oct 17;46:e118. Doi:10.1038/emm.2014.65. Pubmed PMID: 25323788.

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

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

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

Menezes R, Garlet TP, Letra A, Bramante CM, Campanelli AP, Figueira Rde C, Sogayar MC, Granjeiro JM, Garlet GP. Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):932-8. doi: 10.1016/j.joen.2008.05.002. PubMed PMID: 18634923; PubMed Central PMCID: PMC2719712.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Salinas-Muñoz M, Garrido-Flores M, Baeza M, Huamán-Chipana P, García-Sesnich J, Bologna R, et al. Bone resorptive activity in symptomatic and asymptomatic apical lesions of endodontic origin. *Clin Oral Investig*. 2017 Nov;21(8):2613-2618. doi: 10.1007/s00784-017-2062-x. Epub 2017 Mar 6. PubMed PMID: 28261746; PubMed Central PMCID: PMC5632344.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Yang S, Zhu L, Xiao L, Shen Y, Wang L, Peng B, et al. Imbalance of interleukin-17+ T-cell and Foxp3+ regulatory T-cell dynamics in rat periapical lesions. *J Endod*. 2014 Jan;40(1):56-62. doi:10.1016/j.joen.2013.09.033. Epub 2013 Nov 6. PubMed PMID: 24331992.

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO A - Comitê de Ética em pesquisa aprovado



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



INSTITUTO DE TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
UNESP

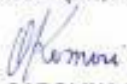


CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 11/2018, intitulado: - "Estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pelo estress crônico e seu efeito na progressão da lesão periapical." sob a responsabilidade de **MARCIA CARNEIRO VALERA**, tendo com colaboradoras :- Mestranda **GIOVANA MINHOTO** e a Profa. Dra. **RENATA FALCHETE DO PRADO**, e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP)**, em reunião de 29/06/2018.

Finalidade	☐ Ensino ☒ Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	29/06/2018 a 30/11/2019
Espécie/inhagem/raça	Rato heterogêneo Wistar
Nº de Animais	48
Peso/idade	200 grs / 45 dias
Sexo	macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 29 de junho de 2018


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