RESSALVA

Atendendo a solicitação do(a) autor(a), o texto completo desse trabalho será disponibilizado no repositório a partir de 26/02/2027.

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

ADRIANE XAVIER DE MORAIS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA ADRENÉRGICA NA REMODELAÇÃO ÓSSEA EM MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL SOB EFEITO DE ESTRESSE CRÔNICO

2025

ADRIANE XAVIER DE MORAIS

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA ADRENÉRGICA NA REMODELAÇÃO ÓSSEA EM MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL SOB EFEITO DE ESTRESSE CRÔNICO

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos do Mestrado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Patologia e Diagnóstico Bucal. Linha de pesquisa: Inflamação, Reparação Tecidual e Patologia do Sistema Estomatognático.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Falchete do Prado

São José dos Campos

2025

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2025]. 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).

Morais, Adriane Xavier de
Avaliação dos efeitos da modulação farmacológica adrenérgica na remodelação óssea em modelo experimental animal sob efeito de estresse crônico / Adriane Xavier de Morais. - São José dos Campos : [s.n.], 2025.
90 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2025.
Orientadora: Renata Falchete Do Prado.

1. Osso. 2. Estresse crônico. 3. Modulação adrenérgica. I. Prado, Renata Falchete Do, 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.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática, ICMC/USP
com adaptações - STATI, STRAUD e DTI do ICT/UNESP.
Renata Aparecida Couto Martins CRB-8/8376

IMPACTO SOCIAL DESTA PESQUISA

Diante dos impactos biológicos e sociais que o estresse crônico exerce sobre a população, torna-se imprescindível uma compreensão abrangente de todos os aspectos fisiológicos envolvidos em seu processo. A análise dos mecanismos de interação entre fatores ambientais, psicológicos e biológicos é fundamental e beneficia significativamente desde as populações mais vulneráveis, principalmente aquelas com distúrbios e desordens ósseas ou correlacionadas.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Given the biological and social impacts that chronic stress exerts on populations, a comprehensive understanding of all the physiological aspects involved in this process becomes imperative. The analysis of the interaction mechanisms among environmental, psychological, and biological factors is fundamental and significantly benefits even the most vulnerable populations, particularly those with bone disorders or related conditions.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª Renata Falchete do Prado (Orientadora)
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus São José dos Campos

Prof Dr Emanuel da Silva Rovai
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus São José dos Campos

Profª Drª Ana Luiza do Rosário Palma
Universidade Anhembi Morumbi
Campus São José dos Campos

São José dos Campos, 26 de fevereiro de 2025

DEDICATÓRIA

Dedico, primeiramente, à **Adriane criança**, que sonhava em fazer parte de algo maior, pois conseguimos!

Ao meu esposo, **William**, que me apoiou de todas as formas para que eu conseguisse concluir essa extensa caminhada.

Ao meu filho, **Matheus**, que me fez ter mais fascínio e curiosidade pela ciência. Posso dizer que foi meu motor propulsor.

Aos meus pais, **Valdinei e Vera**, que da maneira simples deles, me mostraram que eu estava no caminho certo e demonstraram imenso carinho e orgulho por mim.

A minha irmã **Ariane**, que infelizmente não está mais entre nós, mas que ainda mora em meus pensamentos e, principalmente, em meu coração.

Aos meus professores mais queridos e dedicados, desde o Ensino Primário: **Marli, Marlene, Alcione, Alfredo, Jayro, Gilmar, Fatinha, Marilucy**. Médio: **Solange, Lilian, Quincas, Mirtes**. Técnico: **Nadege, Rogério, Leandro, Marcelo, Claudio**. 1ª graduação: **Marcello, Malu, Renata**. 2ª graduação: **Ana Luiza, Mario, Fernanda, Adeline, Matheus, André, João, Leticia e Maju**.

AGRADECIMENTOS

A minha querida amiga/professora **Adeline**, quem mais acreditou em mim ao fim da graduação e me enviou o edital de inscrição para o processo seletivo do CASB, com extrema assertividade.

As minhas amigas/irmãs de mestrado **Thais, Marília, Letícia e Gieyse**, as “garotas da Pato”, a **Lara** da micro, pois sem vocês eu não teria tanta força para continuar essa intensa jornada.

A minha orientadora, **Renata Falchete**, que me acolheu, me ajudou a focar no melhor caminho, esteve comigo em laboratórios e me ofereceu todas as oportunidades possíveis. Me senti como uma plantinha sendo regada até florescer!

Aos meus alunos de IC, **André, Leticia, Lucas, Marcos e Nalin**, em ordem alfabética para não dar briga. Foi realmente um prazer passarmos esse tempo juntos. O futuro de vocês é brilhante.

“Agora, isto não é o fim. Nem sequer é o começo do fim. Mas é, talvez, o fim do começo”. Winston Churchill

RESUMO

Morais AX. Avaliação dos efeitos da modulação farmacológica adrenérgica na remodelação óssea em modelo experimental animal sob efeito de estresse crônico [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2025.

Para alcançar taxas adequadas de crescimento e remodelação, o tecido ósseo depende de vias complexas de sinalização e mecanismos de controle. Nesse controle, estão incluídos diversos fatores: mecânicos, parácrinos/autócrinos e hormonais. Complementarmente, o sistema nervoso simpático (SNS) também têm se demonstrado como um mecanismo de regulação e controle para o osso e o periósteo, com base em diversos estudos anatômicos, farmacológicos e genéticos focados na sinalização dos receptores adrenérgicos. Dessa maneira, fatores de risco nervosos parecem ser importantes para a etiologia de doenças ósseas. O SNS é um componente intrínseco do mecanismo de adaptação a situações de estresse, supondo-se assim, que possa ter impacto direto na homeostase óssea. Esse estudo teve como objetivo analisar a influência do estresse crônico, demonstrando se sua presença tem efeitos na estrutura óssea mandibular e se a modulação farmacológica com bloqueadores inespecíficos adrenérgicos α e β, podem influenciar o processo de remodelação óssea. Foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais em ratos: Não Estressado (NE); Estressado com injeções de Solução Salina (ES); Estressado com injeções de α-bloqueador (EA); Estressado com injeções de β-bloqueador (EB). Para tanto, foi utilizado modelo animal de indução de estresse crônico moderado (aprovado na CEUA sob Parecer nº 01/2016 de 11/03/2016), análises radiográficas, microtomográficas, histomorfométricas e imunoistoquímicas das hemi-mandíbulas direitas de ratos Wistar (*Rattus novergicus*). Os dados foram analisados por testes estatísticos inferenciais paramétricos e não paramétricos, conforme normalidade. Como resultado, a análise qualitativa das reconstruções de microtomografias em 3D revelou diferenças morfológicas bastante perceptíveis entre os grupos experimentais. Os grupos NE e ES apresentaram volume ósseo visivelmente menores, com características semelhantes entre si, enquanto os grupos EA e EB demonstraram maior volume da massa óssea mandibular, com aspecto qualitativamente superior. Esses achados, embora não avaliados quantitativamente, indicam possível tendência da preservação ou aumento da massa óssea em resposta à modulação farmacológica do SNS, sendo assim, os dados qualitativos mostram a relevância de análises multimodais complementares na avaliação da modulação da remodelação óssea. Os dados quantitativos, obtidos por análises radiográficas, histomorfométricas e imunoistoquímicas (Osteocalcina, Rank-L e Osteoprotegerina), não apresentaram valores estatisticamente significantes entre os grupos experimentais. Conclui-se que, nas condições experimentais deste estudo, a exposição ao estresse crônico e a modulação farmacológica dos receptores adrenérgicos α e β pode não exercer um impacto mensurável na remodelação óssea mandibular.

Palavras-chave: osso; estresse crônico; modulação adrenérgica.

ABSTRACT

Morais AX. Avaluation of the effects of pharmacological adrenergic modulation on bone remodeling in an experimental animal model under chronic stress conditions [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2025.

To achieve adequate rates of growth and remodeling, bone tissue relies on complex signaling pathways and regulatory mechanisms. This control includes various factors: mechanical, paracrine/autocrine, and hormonal. Additionally, the sympathetic nervous system (SNS) has also been shown to act as a regulatory and control mechanism for bone and periosteum, based on various anatomical, pharmacological, and genetic studies focusing on adrenergic receptor signaling. Thus, nervous risk factors appear to be important in the etiology of bone diseases. The SNS is an intrinsic component of the adaptative mechanism to stress situations, and is therefore assumed that it may directly impact bone homeostasis. This study aimed to analyze the influence of chronic stress and to determine whether its presence affects mandibular bone structure, as well as whether pharmacological modulation using non-specific α and β adrenergic blockers may influence the bone remodeling process. The following experimental groups were established in rats: Non-Stressed (NS); Stressed with Saline Solution injections (SS); Stressed with α-blocker injections (SA); Stressed with β-blocker injections (SB). A moderate chronic stress induction animal model was used (approved by the CEUA under Opinion No. 01/2016 dated 03/11/2016), along with radiographic, microtomographic, histomorphometric, and immunohistochemical analyses of the right hemimandibles of Wistar rats (Rattus norvegicus). Data were analyzed using parametric and non-parametric inferential statistical tests, according to data normality. As a result, the qualitative analysis of 3D micro-CT reconstructions revealed clearly perceptible morphological differences among the experimental groups. The NE and ES groups showed visibly reduced bone volume, with similar structural characteristics, while the EA and EB groups demonstrated greater mandibular bone mass volume, with qualitatively superior morphology. Although not supported by statistical significance, these findings suggest a potential trend toward the preservation or increase of bone mass in response to pharmacological modulation of the SNS. Thus, the qualitative data highlight the relevance of complementary multimodal approaches in the assessment of bone remodeling modulation. Quantitative data obtained from radiographic, histomorphometric, and immunohistochemical analyses (Osteocalcin, RANK-L, and Osteoprotegerin) did not show statistically significant differences among the experimental groups. It is concluded that, under the experimental conditions of this study, exposure to chronic stress and pharmacological modulation of α- and β-adrenergic receptors may not exert a measurable impact on mandibular bone remodeling.

Key-words: bone; chronic stress; adrenergic modulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento Experimental 26
Figura 2 - Processo de obtenção das imagens radiográficas 27
Figura 3 - Imagens radiográficas de um dos grupos 28
Figura 4 - Interface do software GIMP 30
Figura 5 – Seleção da imagem a ser processada 30
Figura 6 – Rotação da imagem 31
Figura 7 – Imagem rotacionada 31
Figura 8 – Recorte da área de interesse 32
Figura 9 – Ajuste da dimensão da imagem 32
Figura 10 – Imagem gerada 33
Figura 11 – Exportação da imagem 33
Figura 12 – Passo a passo do processamento da imagem 34
Figura 13 – Aplicação do Filtro Gaussiano 34
Figura 14 – Filtro Gaussiano 35
Figura 15 – Selecionar e abrir a mesma imagem 35
Figura 16 – Processamento da imagem 36
Figura 17 – Tratamento da segunda imagem aberta 36
Figura 18 – Imagens geradas pelo software 37
Figura 19 - Inserção do valor 128 para cálculo 37
Figura 20 – Processo de binarização da imagem 38
Figura 21 – Aplicação de filtro de corrosão 38
Figura 22 – Aplicação de filtro de dilatação 39
Figura 23 – Inversão da imagem 39
Figura 24 – Processo de esqueletização da imagem 40
Figura 25 – Contagem de fractais 40

Figura 26 – Resultado final do processamento 41
Figura 27 – Equipamento de microtomografia 42
Figura 28 – Escolha do eixo transaxial 42
Figura 29 – Software CTAnalyser 43
Figura 30 – Padronização da ROI 43
Figura 31 – Etapas iniciais do processamento histológico 44
Figura 32 - Coloração em HE 45
Figura 33 – Visualização dos campos fotografados 46
Figura 34 – Seleção da imagem 47
Figura 35 - Etapas da planimetria 47
Figura 36 – Medição da distância 48
Figura 37 – Unidade de medida 48
Figura 38 – Análise da imagem 49
Figura 39 – Distância entre pixels 49
Figura 40 – Adição do Grid 50
Figura 41 – Grid 50
Figura 42 – Início da contagem de pontos 51
Figura 43 – Resultado da planimetria 51
Figura 44 – Área demarcada para contagem de Osteoclastos 52
Figura 45 – Contagem de Osteoclastos 53
Figura 46 – Osteoprotegerina 55
Figura 47 – Osteocalcina 56
Figura 48 – RANK-L 56
Figura 49 - Histograma de dimensões fractais 57
Figura 50 – Região de interesse 58
Figura 51 – Resultado da reconstrução em 3D 59
Figura 52 - Resultados da planimetria 60

Figura 53 – Análise estatística da presença de osteoclastos..... 61

Figura 54 – Testes estatísticos entre grupos de OPG..... 62

Figura 55 - Testes estatísticos entre grupos de OC 63

Figura 56 - Testes estatísticos entre grupos de RL 64

Figura 57 – Gráfico comparativo..... 65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO DA LITERATURA 17
3 PROPOSIÇÃO 23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....24
4.1 Delineamento Experimental.....24
4.1.1 Indução do Estresse Crônico Moderado 25
4.1.2 Eutanásia.....26
4.2 Radiografias.....27
4.2.1 Índice de Fractal 28
4.3 Microtomografia 41
4.4 Processamento Tecidual 44
4.4.1 Histomorfometria.....45
4.4.2 Planimetria por contagem de pontos.....45
4.4.3 Contagem de Osteoclastos 51
4.4.4 Imunoistoquímica.....53
5 RESULTADOS.....57
5.1 Análise Fractal 57
5.2 Reconstrução de Microtomografias em 3D.....57
5.3 Planimetria por contagem de pontos.....60
5.4 Contagem de Osteoclastos 60
5.5 Imunoistoquímica.....61
5.5.1 Osteoprotegerina.....61
5.5.2 Osteocalcina 62
5.5.3 RANK-L.....63
5.5.4 Razão de proporção OPG e RANK-L.....64
6 DISCUSSÃO 66

7 CONCLUSÃO **72**

REFERÊNCIAS **73**

APÊNDICE **80**

ANEXO **89**

1 INTRODUÇÃO

A remodelação óssea é um processo contínuo e dinâmico, pelo qual o tecido ósseo trabalha para a manutenção da homeostase do organismo – este equilíbrio depende da ação de células como os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção e dos osteoblastos, responsáveis pela neoformação óssea. Diferentemente da reparação óssea, a remodelação não depende exclusivamente de estímulos externos para acontecer, ela ocorre a todo instante; a reparação óssea, por outro lado, ocorre em situações de agressão como fraturas ou osteotomias, ou seja, necessita de um estímulo externo ao organismo para que ocorra formação óssea.

Usualmente, o crescimento e a remodelação óssea dependem de diversos fatores, entre eles, mecanismos hormonais (hormônios tireoidianos, calcitonina, paratormônio, glicocorticóides e esteróides sexuais), autócrinos/parácrinos (citocinas, fatores de crescimento, prostaglandinas) e mecânicos. Adicionalmente, neuromediadores transmitidos por fibras nervosas, segundo alguns estudos, têm se mostrado como um rico suprimento sinalizador para o osso e o periósteo, seja por meio do aumento ou da diminuição da massa óssea, regulando desenvolvimento e função de osteoclastos e osteoblastos, destacando a importância da regulação neurogênica no metabolismo ósseo (Takeda et al., 2002; Kondo e Togari, 2003; Chenu, 2004; Sun et al., 2023).

O sistema nervoso simpático (SNS) representa uma das principais ligações entre o sistema nervoso central (SNC) e o osso, com base em vários estudos anatômicos, farmacológicos e genéticos a respeito da sinalização do receptor β-adrenérgico (βAR) em células ósseas. Dessa forma, o SNC, por meio da sinalização do SNS e dos receptores adrenérgicos β, desempenha um papel fundamental na regulação da homeostase óssea. Dados pré-clínicos e clínicos, sugerem que o aumento da atividade simpática e a redução da atividade parassimpática podem contribuir para a osteoporose. Além disso, o estresse psicológico crônico, ao ativar de forma persistente o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e elevar os níveis de cortisol, pode impactar negativamente na remodelação óssea e reduzir a densidade mineral óssea, mostrando que fatores psicológicos e neurológicos podem ser considerados elementos de importância na etiologia da osteoporose, doença de grande importância médica (Kubo et al., 1999; Kelly et al., 2019).

Assim, o SNS é um componente intrínseco do mecanismo regulador da homeostase óssea, mostrando efeitos de natureza endócrina (Elefteriou et al.,2013). Um exemplo da ação do sistema nervoso na remodelação óssea é revelado por sua capacidade de modulação dos efeitos da leptina. Esse hormônio demonstrou-se como um potente regulador da massa óssea, atuando como inibidor da formação óssea. O sistema nervoso simpático é o mediador dessa função, agindo por meio de receptores β2-adrenérgicos que estão presentes nos osteoblastos (Karsenty e Ducy, 2006).

Outro receptor importante na remodelação óssea é o β1-adrenérgico, esse receptor apresenta características distintas do β2. Por exemplo, o β1 não é expresso no osso e, segundo estudos, é possível que a sinalização dele possa estimular a formação óssea indiretamente ou sistemicamente, ao contrário do receptor β2 adrenérgico que tem efeitos inibitórios nos osteoblastos (Bonnet et al., 2008). A ação simpática na remodelação óssea ocorre em diferentes níveis, desde o sistema nervoso central até o nível celular, atuando sobre as células ósseas (Reid, 2008).

No entanto, mesmo após demonstrações da capacidade do sistema adrenérgico em atuar na regulação da remodelação óssea, experimentos farmacológicos têm produzido resultados controversos (Bonnet et al., 2008). Enquanto nota-se que a estimulação da sinalização simpática provoca a reabsorção óssea tanto em roedores como em humanos, contraditoriamente, a superestimulação do sistema simpático mostra capacidade de provocar aumento na massa óssea (Limonard et al., 2016).

7 CONCLUSÃO

A análise qualitativa das reconstruções tridimensionais por microtomografias revelaram diferenças morfológicas bastante perceptíveis entre os grupos, reforçando a importância e a necessidade de estudos complementares, com maior poder amostral, com diferentes regiões anatômicas e acréscimo de novas técnicas de avaliação da massa óssea, especialmente dos tecidos mais sutis e delicados, como no caso da massa óssea mandibular, região periapical ou crista óssea alveolar.

No entanto, de acordo com os resultados quantitativos obtidos no estudo, em função da não significância estatística entre grupos, não foi possível determinar o nível de influência do estresse crônico sobre a massa óssea mandibular, em região periapical, em estado de estresse crônico, porém, os achados sugerem que possam haver alterações nos tecidos periapicais, possivelmente não identificáveis através das técnicas utilizadas, principalmente pelo fato da região ser alvo de constante remodelação óssea, devido à carga mastigatória elevada nos tecidos alvo do estudo.

Também não foi possível comprovar efeitos protetivos da modulação farmacológica na massa óssea mandibular em animal experimental e a ausência de significância estatística entre os grupos demonstra que as alterações nos tecidos periodontais podem ser muito sutis ou insuficientes para uma alteração fisiológica rastreável pelas técnicas de estudo utilizadas.

REFERÊNCIAS

Andersen KJ, Knudsen AR, Wiborg O, Mortensen FV. Chronic stress does not impair liver regeneration in rats. *Regen Med Res.* 2015;3:2. doi:10.1186/s40340-015-0011-8

Azuma K, Adachi Y, Hayashi H, Kubo KY. Chronic psychological stress as a risk factor of osteoporosis. *J UOEH.* 2015;37(4):245–253. doi:10.7888/juoeh.37.245

Baek K, Park HJ, Baek JH, Kim HR. Isoproterenol increases RANKL expression in a ATF4/NFATc1-dependent manner in mouse osteoblastic cells. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10):2204. doi:10.3390/ijms18102204

Balog M, Miljanović M, Blažetić S, Labak I, Ivić V, Viljetić B, et al. Sex-specific chronic stress response at the level of adrenal gland modified sexual hormone and leptin receptors. *Croat Med J.* 2015;56(2):104–113. doi:10.3325/cmj.2015.56.104

Berger JM, Singh P, Khrimian L, Morgan DA, Chowdhury S, Arteaga-Solis E, et al. Mediation of the acute stress response by the skeleton. *Cell Metab.* 2019;30(5):890–902. doi: 10.1016/j.cmet.2019.08.012

Bergström A, Jayatissa MN, Mørk A, Wiborg O. Stress sensitivity and resilience in the chronic mild stress rat model of depression; an in situ hybridization study. *Brain Res.* 2008;1196:41–52. doi:10.1016/j.brainres.2007.12.025

Bonnet N, Pierroz D, Ferrari S. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008;8(2):94–104. PMID: 18622078

Bonnet N, Benhamou C, Brunet-Imbault B, Arlettaz A, Horcajada M, Richard O, et al. Severe bone alterations under β2-agonist treatments: bone mass, microarchitecture and strength analyses in female rats. *Bone.* 2005;37(5):622–633. doi: 10.1016/j.bone.2005.07.012

Chen D, Wang Z. Adrenaline inhibits osteogenesis via repressing miR-21 expression. *Cell Biol Int.* 2016;40(12):1300–1307. doi:10.1002/cbin.10685

Chenu C. Role of innervation in the control of bone remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004;4(2):132–134. PMID:15615111

Chichinadze K, Chichinadze N. Stress-induced increase of testosterone: contributions of social status and sympathetic reactivity. Physiol Behav. 2008;94(4):595–603. doi:10.1016/j.physbeh.2008.03.020

Dalla C, Antoniou K, Drossopoulou G, Xagoraris M, Kokras N, Sfikakis A, Papadopoulou-Daifoti Z. Chronic mild stress impact: are females more vulnerable? Neuroscience. 2005;135(3):703–714. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.06.068

De Souza RL, Pitsillides AA, Lanyon LE, Skerry TM, Chenu C. Sympathetic nervous system does not mediate the load-induced cortical new bone formation. J Bone Miner Res. 2005;20(12):2159–2168. doi:10.1359/JBMR.050812

Elefteriou F, Campbell P, Ma Y. Control of bone remodeling by the peripheral sympathetic nervous system. Calcif Tissue Int. 2014;94(1):140–151. doi:10.1007/s00223-013-9752-4

Epel ES. Psychological and metabolic stress: a recipe for accelerated cellular aging? Hormones (Athens). 2009;8(1):7–22. doi:10.14310/horm.2002.1217

Fonseca TL, Jorgetti V, Costa CC, Capelo LP, Covarrubias AE, Moulatlet AC, et al. Double disruption of α2A- and α2C-adrenoceptors results in sympathetic hyperactivity and high-bone-mass phenotype. J Bone Miner Res. 2011;26(3):591–603. doi:10.1002/jbmr.243

Georgiou AC, Cornejo Ulloa P, Van Kessel GMH, Crielaard W, Van der Waal SV. Reactive oxygen species can be traced locally and systemically in apical periodontitis: a systematic review. Arch Oral Biol. 2021;129:105167. doi:10.1016/j.archoralbio.2021.105167

Gunes N, Gül M, Dundar S, Artas G, Kobat MA, Tekin S, Bozoglan A, Isayev A. Effects of systemic propranolol application on the new bone formation in peri-implant guided bone regeneration. J Oral Maxillofac Res. 2021;12(3):e2. doi:10.5037/jomr.2021.12302

Henneicke H, Li J, Kim S, Gasparini SJ, Seibel MJ, Zhou H. Chronic mild stress causes bone loss via an osteoblast-specific glucocorticoid-dependent mechanism. Endocrinology. 2017;158(6):1939–1950. doi:10.1210/en.2016-1658

Hersh EV, Lindemeyer RG. Phentolamine mesylate for accelerating recovery from lip and tongue anesthesia. Dent Clin North Am. 2010;54(4):631–642. doi:10.1016/j.cden.2010.06.004

Huang, J., Wu, T., Jiang, Y. R., Zheng, X. Q., Wang, H., Liu, H., Wang, H., Leng, H. J., Fan, D. W., Yuan, W. Q., & Song, C. L. (2024). β-Receptor blocker enhances the anabolic effect of PTH after osteoporotic fracture. Bone research, 12(1), 18. Doi:10.1038/s41413-024-00321-z

Jahn, D., Knapstein, P. R., Otto, E., Köhli, P., Sevecke, J., Graef, F., Graffmann, C., Fuchs, M., Jiang, S., Rickert, M., Erdmann, C., Appelt, J., Revend, L., Küttner, Q., Witte, J., Rahmani, A., Duda, G., Xie, W., Donat, A., Schinke, T., … Keller, J. (2023). Increased beta2-adrenergic signaling is a targetable stimulus essential for bone healing by promoting callus neovascularization. bioRxiv : the preprint server for biology, 2023.07.14.548550. doi:10.1101/2023.07.14.548550

Karsenty G, Ducy P. The hypothalamic control of bone mass, implication for the treatment of osteoporosis. Ann Endocrinol (Paris). 2006 Apr;67(2):123. doi:10.1016/s0003-4266(06)72566-5

Kelly, R. R., McDonald, L. T., Jensen, N. R., Sidles, S. J., & LaRue, A. C. (2019). Impacts of Psychological Stress on Osteoporosis: Clinical Implications and Treatment Interactions. Frontiers in Psychiatry, 10, 200. doi:10.3389/fpsyt.2019.00200

Khoury RD, Prado RF, Matos FS, Meireles BR, Cardoso FGR, Oliveira LD, et al. The influence of adrenergic blockade in rats with apical periodontitis under chronic stress conditions. Arch Oral Biol. 2020;110:104590. doi:10.1016/j.archoralbio.2019.104590

Khoury RD, Minhoto GB, de Barros PP, Junqueira JC, Gagliardi CF, do Prado RF, Valera MC. Systemic administration of propranolol reduces bone resorption and inflammation in apical periodontitis of chronically stressed rats. Int Endod J. 2024;[Epub ahead of print]:iej.14118. doi:10.1111/iej.14118

Kondo A, Togari A. In vivo stimulation of sympathetic nervous system modulates osteoblastic activity in mouse calvaria. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003;285(3):E661–E667. doi:10.1152/ajpendo.00026.2003

Kondo H, Togari A. Continuous treatment with a low-dose β-agonist reduces bone mass by increasing bone resorption without suppressing bone formation. Calcif Tissue Int. 2011;88(1):23–32. doi:10.1007/s00223-010-9421-9

Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe M, et al. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. J Steroid Biochem Mol Biol. 1999;68(5–6):197–203. doi:10.1016/S0960-0760(99)00032-1

Levine S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. Psychoneuroendocrinology. 2005;30(10):939–946. doi:10.1016/j.psyneuen.2005.03.013

Limonard EJ, Schoenmaker T, de Vries TJ, Tanck MW, Heijboer AC, Endert E, et al. Clonidine increases bone resorption in humans. Osteoporos Int. 2016;27(3):1063–1071. doi:10.1007/s00198-015-3312-x

Liu S, Li T, Liu H, Wang X, Bo S, Xie Y, et al. Resveratrol exerts antidepressant properties in the chronic unpredictable mild stress model through the regulation of oxidative stress and mTOR pathway in the rat hippocampus and prefrontal cortex. Behav Brain Res. 2016;302:191–199. doi:10.1016/j.bbr.2016.01.037

Loureiro C, Buzalaf MAR, Ventura TMO, Pelá VT, Rodrigues GWL, Andrade JG, et al. Teeth with acute apical abscess vs. teeth with chronic apical periodontitis: a

quantitative and qualitative proteomic analysis. Clin Oral Investig. 2023;27(2):591–601. doi:10.1007/s00784-022-04754-w

Lu H, Xu M, Wang F, Liu S, Gu J, Lin S. Chronic stress enhances progression of periodontitis via α1-adrenergic signaling: a potential target for periodontal disease therapy. Exp Mol Med. 2014;46(10):e118. doi:10.1038/emm.2014.65

Marenzana M, De Souza RL, Chenu C. Blockade of beta-adrenergic signaling does not influence the bone mechano-adaptive response in mice. Bone. 2007;41(1):206–215. doi:10.1016/j.bone.2007.04.184

Matchkov VV, Kravtsova VV, Wiborg O, Aalkjaer C, Bouzinova EV. Chronic selective serotonin reuptake inhibition modulates endothelial dysfunction and oxidative state in rat chronic mild stress model of depression. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2015;309(8):R814–R823. doi:10.1152/ajpregu.00337.2014

Matos FS, do Prado RF, Khoury RD, de Oliveira LD, Valera MC, Tomson PL, et al. Anti-inflammatory and anti-resorptive efficacy of adrenergic blockers on late replanted rat incisors. Dent Traumatol. 2020;36(3):253–263. doi:10.1111/edt.12523

Mavropoulos A, Kiliaridis S, Rizzoli R, Ammann P. Normal masticatory function partially protects the rat mandibular bone from estrogen-deficiency induced osteoporosis. J Biomech. 2014;47(11):2666–2671. doi:10.1016/j.jbiomech.2014.05.012

McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. Brain Res. 2000;886(1–2):172–179. doi:10.1016/S0006-8993(00)02950-4

Minhoto GB, Khoury RD, Orozco EIF, Prado RF, Valera MC. Effect of chronic unpredictable stress on the progression of experimental apical periodontitis in rats. Int Endod J. 2021;54(8):1342–1352. doi:10.1111/iej.13515

Minkowitz B, Boskey A, Lane J, Pearlman H, Vigorita V. Effects of propranolol on bone metabolism in the rat. J Orthop Res. 1991;9(6):869–875. doi:10.1002/jor.1100090613

Nishiura T, Abe K. Alpha1-adrenergic receptor stimulation induces expression of RANKL gene via PKC and ERK pathways in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. Arch Oral Biol. 2007;52(8):778–785. doi:10.1016/j.archoralbio.2007.01.005

Pacák K. Stressor-specific activation of the hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis. Physiol Res. 2000;49(Suppl 1):S11–S17. PMID: 10984067

Patterson-Buckendahl P. Osteocalcin is a stress-responsive neuropeptide. Endocrine Regul. 2011;45(2):99–110. doi: 10.4149/endo_2011_02_99

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(4):697–704. doi:10.1902/jop.2008.070369

Pierroz D, Bouxsein M, Rizzoli R, Ferrari S. Combined treatment with a beta-blocker and intermittent PTH improves bone mass and microarchitecture in ovariectomized mice. Bone. 2006;39(2):260–267. doi:10.1016/j.bone.2006.01.145

Ramos-Vara J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. Veterinary pathology, 42(4), 405–426. doi:10.1354/vp.42-4-405

Reid IR. Effects of beta-blockers on fracture risk. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2008;8(2):105–110. PMID: 18622079

Rejnmark L, Vestergaard P, Kassem M, Christoffersen B, Kolthoff N, Brixen K, et al. Fracture risk in perimenopausal women treated with betablockers. Calcif Tissue Int. 2004 Nov;75(5):365-72. doi: 10.1007/s00223-004-0222-x

Rentscher, K. E., Carroll, J. E., Polsky, L. R., & Lamkin, D. M. (2022). Chronic stress increases transcriptomic indicators of biological aging in mouse bone marrow leukocytes. Brain, behavior, & immunity - health, 22, 100461. https://doi.org/10.1016/j.bbih.2022.100461

Retana-Márquez S, Bonilla-Jaime H, Vázquez-Palacios G, Martínez-García R, Velázquez-Moctezuma J. Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. Horm Behav. 2003;44(4):327–337. doi:10.1016/j.yhbeh.2003.04.001

Riggs BL, Khosla S, Melton LJ III. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. Endocr Rev. 2002;23(3):279–302. doi:10.1210/edrv.23.3.0465

Rodrigues, W. F., Madeira, M. F., da Silva, T. A., Clemente-Napimoga, J. T., Miguel, C. B., Dias-da-Silva, V. J., Barbosa-Neto, O., Lopes, A. H., & Napimoga, M. H. (2012). Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. British journal of pharmacology, 165(7), 2140–2151. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01686.x

Sato T, Arai M, Goto S, Togari A. Effects of propranolol on bone metabolism in spontaneously hypertensive rats. J Pharmacol Exp Ther.2010 Jul;334(1):99-105. Doi:10.1124/jpet.110.167643

Shir Y, Cameron LB, Raja SN, Bourke DL. The safety of intravenous phentolamine administration in patients with neuropathic pain. Anesth Analg. 1993;76(5):1008-11. doi:10.1213/00000539-199305000-00016

Smith, J. A., Nguyen, T., Davis, B. C., Lahiri, D. K., Hato, T., Obukhov, A. G., & White, F. A. (2023). Propranolol treatment during repetitive mild traumatic brain injuries induces transcriptomic changes in the bone marrow of mice. Frontiers in neuroscience, 17, 1219941. doi:10.3389/fnins.2023.1219941

Sui B, Liu J, Zheng C, et al. Targeted inhibition of osteoclastogenesis reveals the pathogenesis and therapeutics of bone loss under sympathetic neurostress. Int J Oral Sci. 2022;14(1):39. doi:10.1038/s41368-022-00193-1

Sun, W., Ye, B., Chen, S. et al. Neuro-bone tissue engineering: emerging mechanisms, potential strategies, and current challenges. Bone Res **11**(1), 65 (2023). https://doi.org/10.1038/s41413-023-00302-8

Tanaka K, Hirai T, Kodama D, Kondo H, Hamamura K, Togari A. α_1B-Adrenoceptor signalling regulates bone formation through the up-regulation of CCAAT/enhancer-binding protein δ expression in osteoblasts. Br J Pharmacol. 2016;173(6):1058-1069. doi:10.1111/bph.13418

Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. Cell. 2002;111(3):305–317. doi:10.1016/S0092-8674(02)01049-8

Teixeira MBCG, Martins GM, Miranda-Rodrigues M, De Araújo IF, Oliveira R, Brum PC, Azevedo Gouveia CH. Lack of α2C-Adrenoceptor results in contrasting phenotypes of long bones and vertebra and prevents the thyrotoxicosis-induced osteopenia. PLoS One. 2016;11(1):e0146795. doi:10.1371/journal.pone.0146795

Togari A, Arai M, Kondo A. The role of the sympathetic nervous system in controlling bone metabolism. Expert Opin Ther Targets. 2005;9(5):931–940. doi:10.1517/14728222.9.5.931

Tomomitsu T, Mimura H, Murase K, Sone T, Fukunaga M. Fractal analysis of bone architecture at distal radius. Nihon Hoshasen Gijutsu Gakkai Zasshi. 2005;61(12):1592–1598. doi:10.6009/jjrt.kj00004022969

Treyball A, Bergeron AC, Brooks DJ, Langlais AL, Hashmi H, Nagano K, et al. Propranolol promotes bone formation and limits resorption through novel mechanisms during anabolic parathyroid hormone treatment in female C57BL/6J mice. J Bone Miner Res. 2022;37(5):954–971. doi:10.1002/jbmr.4523

Tsuchiya T, Horii I. Different effects of acute and chronic immobilization stress on plasma testosterone levels in male Syrian hamsters. *Psychoneuroendocrinology.* 1995;20(1):95–102. doi:10.1016/0306-4530(94)00047-6

Valente FL, Ferreira APBR, da Costa LD, Louzada MJQ, Patarroyo JH, Vargas MI. Effects of chronic mild stress on parameters of bone assessment in adult male and

female rats. Pesq Vet Bras. 2016;36(Supl 1):106–112. doi:10.1590/S0100-736X2016001300016

Wainwright SR, Workman JL, Tehrani A, Hamson DK, Chow C, Lieblich SE, Galea LAM. Testosterone has antidepressant-like efficacy and facilitates imipramine-induced neuroplasticity in male rats exposed to chronic unpredictable stress. Horm Behav. 2016;79:58–69. doi:10.1016/j.yhbeh.2016.01.001

Wiens M, Etminan M, Gill SS, Takkouche B. Effects of antihypertensive drug treatments on fracture outcomes: a meta-analysis of observational studies. J Intern Med. 2006;260(4):350–362. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01695.x

Willner P, Muscat R, Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. Neurosci Biobehav Rev. 1992;16(4):525–534. doi:10.1016/S0149-7634(05)80194-0

Yirmiya R, Goshen I, Bajayo A, Kreisel T, Feldman S, Tam J, Trembovler V, Csernus V, Shohami E, Bab I. Depression induces bone loss through stimulation of the sympathetic nervous system. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(45):16876–16881. doi:10.1073/pnas.0604234103

Zeman R, Hirschman A, Hirschman M, Guo G, Etlinger J. Clenbuterol, a beta2-receptor agonist, reduces net bone loss in denervated hindlimbs. Am J Physiol. 1991;261(2 Pt 1):E285–E289. doi: 10.1152/ajpendo.1991.261.2.E285

Zhang Y, et al. The RANK/RANKL/OPG system and tumor bone metastasis: potential mechanisms and therapeutic strategies. Front Endocrinol (Lausanne). 2022;13:1063815. doi:10.3389/fendo.2022.1063815

Zhou J, Liu Z, Yu J, Han X, Fan S, Shao W, Chen J, Qiao R, Xie P. Quantitative proteomic analysis reveals molecular adaptations in the hippocampal synaptic active zone of chronic mild stress-unsusceptible rats. Int J Neuropsychopharmacol. 2015;19(1):pyv100. doi:10.1093/ijnp/pyv100