



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

GIOVANNA BIGNOTO MINHOTO

**EFEITO DA SINVASTATINA E DO PROPRANOLOL NO
DESENVOLVIMENTO DA LESÃO PERIAPICAL DE RATOS
SUBMETIDOS AO ESTRESSE**

2023

GIOVANNA BIGNOTO MINHOTO

**EFEITO DA SINVASTATINA E DO PROPRANOLOL NO DESENVOLVIMENTO
DA LESÃO PERIAPICAL DE RATOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE**

Tese 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 DOUTOR, 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

Coorientadora: Dra Rayana Duarte Khoury

São José dos Campos

2023

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2023]. 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

Efeito da sinvastatina e do propranolol no desenvolvimento da lesão periapical de ratos submetidos ao estresse / Giovanna Bignoto Minhoto. - São José dos Campos : [s.n.], 2023.
77 f. : il.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2023.

Orientador: Marcia Carneiro Valera

Coorientador: Rayana Duarte Khoury

1. Periodontite Apical. 2. Estresse crônico. 3. Sinvastatina. 4. Propranolol. 5. Microtomografia. I. Valera, Marcia Carneiro, orient. II. Khoury, Rayana Duarte, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Titular Marcia Carneiro Valera (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de ciência e tecnologia

Campus de São José dos Campos

Luana Marotta Reis de Vasconcelos

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos campos

Leopoldo Cosme Silva

Universidade Federal de Alagoas (UFAL)

Maceió

Felipe de Souza Matos

Universidade Federal de Campina grande

Santa Cecília

Emmanuel João Nogueira Leal da Silva

Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO)

São José dos Campos, 07 de Março de 2023.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Enio Salim Minhoto e Elci Aparecida Bignoto**,
que com tanto sacrifício investiram em minha formação, permitindo que eu pudesse
escolher os meus caminhos.*

Que me deram apoio incondicional do início da minha vida até o momento.

*À minha querida irmã **Amanda Bignoto Minhoto** que sempre se fez presente.*

À vocês devo tudo que já conquistei e que ainda irei conquistar!!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*À minha orientadora de Mestrado e Doutorado, **Profª Titular Marcia Carneiro Valera.***

Agradeço por ter confiado e acrediado em mim desde o meu início na pós-graduação. Me lembro do meu segundo ano de mestrado, onde a senhora confiando em mim, me passou responsabilidades grandes que me fizeram crescer tanto.. e o crescimento foi notório por todos ao redor. Saiba que isso foi muito importante para minha vida e para minha carreira.

Agradeço pelo apoio incondicional nos momentos de angústias, incertezas e inseguranças que vivi ao longo desses cinco anos de pós-graduação. Pelos momentos em que me chamou na sua sala, com muita calma e tranquilidade, chamava para um café e desempenhando o papel de orientadora, me orientou tanto para vida quanto para o trabalho.

Obrigada por tudo, sou muito grata.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças todos os dias para que eu enfrente cada nova batalha.

Por me dar coragem e força de vontade para que eu siga mesmo diante dos obstáculos da vida.

Aos meus **familiares**, que sempre foram muito carinhosos e incentivadores dos meus sonhos, obrigada por cada demonstração de carinho e cuidado.

Especialmente a minha vó **Elza Salim Minhoto** que vibra e torce por mim a cada vitória, obrigada por me colocar nas suas orações. Ao meu tio **Eder Salim Minhoto**, que tanto me inspirou e me incentivou a seguir este caminho. Aos meus avós **Helcio, Djalma e Neide** que sei que torcem por mim aí de cima.

À minha mãe, **Elci**, que com tanto carinho foi meu refugio ao longo desses 10 anos na UNESP, que me ouviu todas as vezes que precisei, que me deu conforto e segurança. Obrigada por ter me dado muito mais que a mão e não ter me deixado desistir. Obrigada pelas noites que a gente jogava conversa fora e por ter ficado ao meu lado naqueles momentos difíceis que só nós duas sabemos. Devo tudo à você. Ao meu pai **Enio**, que sempre confiou em mim, que sempre me incentivou. Obrigada por abrir mão dos seus sonhos as vezes a favor dos nossos sonhos. Obrigada por cada vez que você disse: “Gica, não se preocupa, eu estou aqui para o que precisar.” Saiba que isso fez muita diferença.

À minha irmã, **Amanda**, obrigada pela parceria, obrigada por cuidar de mim. Eu tenho certeza que você é uma das pessoas que mais torce pela minha felicidade e saiba que é recíproco.

Ao meu namorado **Alexandre**, agradeço pelo apoio incondicional ao longo desses 3 anos, obrigada por acreditar em mim nos momentos em que meus olhos se cegam.

Obrigada por cuidar tão bem de mim e da gente. Agradeço também pela compreensão nos momentos difíceis, pela segurança que me deu nessa reta final da pós. Reconheço todos os seus esforços para que eu pudesse correr atrás dos meus sonhos e espero poder retribuir agora na sua jornada. Tenho muito orgulho da história que estamos escrevendo e sei que juntos iremos mais longe.

Ao meu padrasto **Vagner** e a minha madrasta **Simone**, obrigada por cuidarem dos meus pais, principalmente pelo amor e carinho com eles no momento em que me ausento. Obrigada pelo carinho que sentem por mim, a jornada fica mais leve com vocês por perto.

Agradeço a **Marina, Marcelle, Flávia e Renata** que apesar da distância sempre se fizeram presente e sempre me incentivaram. Obrigada pelo carinho mesmo de longe.

Aos meus amigos de pós-graduação, **Amjad, Esteban, Bruna e Cássia**, que me acolheram de braços abertos na vida de pós-graduação e que foram minha família na UNESP. Vocês fizeram falta nesse final.

À minha amiga **Rayana**, que foi bem mais que uma colega de trabalho, que me ensinou absolutamente tudo que precisei para desenvolver minha tese. Obrigada pelos nossos almoços e cafés, onde podíamos conversar sem julgamentos e com muito apoio mútuo. Sabe que sem você, teria sido bem mais difícil, sei que nossa amizade irá permanecer.

Às minhas eternas companheiras de apartamento, **Laís e Victória**, vocês aguentaram meus momentos difíceis ao longo de 4 anos, me deram tanto apoio e não me deixaram desistir. Sei que nossa amizade continuará apesar da distância e do caminho de cada uma. Torço pela felicidade de vocês.

À professora **Luana**, que me ensinou do básico o que era pesquisa, que confiou em mim e me deu as primeiras oportunidades. Obrigada por toda ajuda concedida mesmo quando eu já não era mais sua orientada. Meu carinho e admiração por você só crescem.

Ao professor **Emmanuel João Nogueira Leal da Silva**, que juntamente com sua aluna **Carolina Oliveira de Lima**, estiveram à disposição e fizeram parte deste trabalho, sendo peças fundamentais para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos alunos de iniciação que sempre estavam dispostos a ajudar.

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 doutorado.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

"Conhecimento não é aquilo que você sabe, mas o que você faz com aquilo que
você sabe." (Aldous Huxley)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Modelos de indução de estresse crônico em ratos	20
2.2 Ação da Sinvastatina na perda óssea e no estresse crônico em ratos	22
2.3 Utilização de betabloqueadores adrenérgicos no estresse crônico em ratos	25
3 PROPOSIÇÃO	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Parte 1.....	29
4.1.1 Animais.....	29
4.1.2 Indução do estresse crônico	30
4.1.3 Avaliação da periapicopatia	32
4.1.4 Avaliação comportamental da indução do estresse crônico.....	34
4.1.5 Eutanásia.....	35
4.1.6 Análise microtomográfica da região periapical.....	35
4.1.7 Análise histológica e histomorfométrica.....	37
4.1.8 Análise estatística.....	39
4.2 Parte 2	39
4.2.1 Animais	39
4.2.2 Administração das medicações.....	41
4.2.3 Indução do estresse crônico.....	41

4.2.4 Indução da periapicopatia e eutanásia.....	42
4.2.5 Avaliação comportamental da indução do estresse crônico	42
4.2.6 Análise microtomográfica da região periapical.....	43
4.2.7 Análise histológica e histomorfométrica.....	44
4.2.8 Análise estatística.....	45
5 RESULTADOS.....	46
5.1 Parte 1.....	46
5.1.1 Análises comportamentais	46
5.1.1.1 Ganho de peso.....	46
5.1.1.2 Labirinto em Y.....	47
5.1.1.3 Teste de campo aberto	47
5.1.2 Microtomografia computadorizada.....	48
5.1.3 Análise histológica e histomorfométrica.....	50
5.2 Parte 2.....	53
5.2.1 Análises comportamentais.....	53
5.2.1.1 Ganho de peso.....	53
5.2.1.2 Labirinto em Y	54
5.2.1.3 Teste de campo aberto	55
5.2.2 Microtomografia computadorizada.....	56
5.2.3 Análise histológica e histomorfométrica.....	58
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO.....	77

Minhoto GB. Efeito da sinvastatina e do propranolol no desenvolvimento da lesão periapical de ratos submetidos ao estresse [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2023.

RESUMO

Uma vez que o estresse crônico pode estimular o sistema nervoso simpático, diminuindo a resposta imune, favorecendo a perda óssea frente a um processo inflamatório, os objetivos deste estudo foram: 1) Avaliar os efeitos de modelos de indução de estresse no desenvolvimento da periodontite apical (P.a) e avaliar o nível de estresse gerado pelos mesmos; 2) A partir do melhor protocolo de estresse obtido foi avaliado o perfil inflamatório da PA induzida em animais sob condições de estresse, utilizando sistemicamente a Sinvastatina, Propranolol e a Sinvastatina associada ao propranolol. Na primeira parte foram utilizados 32 ratos Wistar (N=8) divididos aleatoriamente em: SE: sem estresse, sem periodontite apical (P.a); SE+P.a: sem estresse, com P.A; EP+P.a: Estresse previsível + P.a; EI+P.a: estresse imprevisível + P.a. Os animais foram submetidos ao estresse crônico por 42 dias sendo que no dia 21 foi induzida a P.a. Para comprovação do estresse foram utilizadas análises de peso e comportamentais de campo aberto (CA) e labirinto em y (Y). Foram realizadas análises micro tomográfica e histológica para avaliar o efeito de ambas as metodologias sobre a progressão da P.a. Os dados foram avaliados estatisticamente. Observou-se que não houve diferença no ganho de peso entre os animais SE e SE+P.a. Em relação aos grupos estressados o grupo estresse imprevisível apresentou menor ganho de peso quando comparado ao grupo sem estresse. Nos testes comportamentais, Y e CA observou-se um mesmo padrão de comportamento nos animais do grupo SE e SE+P.a ($p>0.05$). Verificou-se diferenças entre os grupos SE+P.a e EI +P.a no volume da lesão periapical, mas não houve diferença entre os protocolos de estresse. A Análise histológica mostrou maior área de P.a nos animais do grupo EI+P.a o que também foi observado pela análise microtomográfica. Na segunda etapa foram utilizados 48 animais divididos em 5 grupos (N=8): SE+P.a: sem estresse e com P.a; E+SS: Estresse + Periodontite Apical + soro; E+SN: Estresse + Periodontite Apical + Sinvastatina; E+P: Estresse + Periodontite Apical + Propranolol e S+SN+P: Estresse + Periodontite Apical + Sinvastatina + Propranolol. O protocolo de estresse utilizado foi o estresse crônico imprevisível por 42 dias. Realizou-se análises de peso e comportamentais de labirinto em y e campo aberto. Após a eutanásia foram realizadas as análises microtomográfica e a análise histológica e histomorfométrica. Os valores obtidos foram analisados estatisticamente. Observou-se que todos os grupos medicados apresentaram ganho de peso maior do que o grupo solução salina. No grupo Sinvastatina e no grupo Propranolol, os animais apresentaram maior atividade locomotora do que no grupo Solução salina. O volume da P.a foi significativamente menor nos grupos Sinvastatina e Propranolol quando comparado ao grupo solução salina. Na análise histológica observou-se que a área da lesão foi significativamente menor nos animais do grupo Sinvastatina quando comparado ao da solução salina, bem como menor intensidade e extensão do infiltrado inflamatório. Concluindo-se que o estresse crônico imprevisível aumenta a perda óssea periapical em animais com PA induzida. Além disso, concluiu-se que tanto a Sinvastatina quanto o Propranolol reduz o estresse crônico, reduzindo a

perda óssea nestes animais.

Palavras-chave: Periodontite apical. Estresse crônico. Sinvastatina. Propranolol
Microtomografia.

Minhoto GB. Effect of Simvastatin and Propranolol on the development of periapical lesions in rats subjected to stress [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2023.

ABSTRACT

Since chronic stress can stimulate the sympathetic nervous system, decreasing the immune response, favoring bone loss in the face of an inflammatory process, the objectives of this study were: 1) To evaluate the effects of stress induction models on the development of apical periodontitis (P.a) and assess the level of stress generated by them; 2) Based on the best stress protocol obtained, the inflammatory profile of BP induced in animals under stress conditions was evaluated, systemically using Simvastatin, Propranolol and Simvastatin associated with propranolol. In the first part, 32 Wistar rats (N=8) were randomly divided into: SE: without stress, without apical periodontitis (P.a); SE+P.a: without stress, with P.A; EP+P.a: Predictable stress + P.a; EI+P.a: unpredictable stress + P.a. The animals were subjected to chronic stress for 42 days, and on the 21st, P.a. To prove the stress, weight and behavioral analyzes of open field (CA) and maze in y (Y) were used. Micro tomographic and histological analyzes were performed to evaluate the effect of both methodologies on the progression of P.a. Data were statistically evaluated. It was observed that there was no difference in weight gain between SE and SE+P.a animals. In relation to the stressed groups, the unpredictable stress group showed less weight gain when compared to the non-stress group. In the behavioral tests, Y and CA, the same pattern of behavior was observed in animals from the SE and SE+P.a groups ($p>0.05$). There were differences between groups SE+P.a and EI +P.a in the volume of the periapical lesion, but there was no difference between the stress protocols. The histological analysis showed a greater area of P.a in the animals from the EI+P.a group, which was also observed by the microtomographic analysis. In the second stage, 48 animals were divided into 5 groups (N=8): SE+P.a: without stress and with P.a; E+SS: Stress + Apical Periodontitis + serum; E+SN: Stress + Apical Periodontitis + Simvastatin; E+P: Stress + Apical Periodontitis + Propranolol and S+SN+P: Stress + Apical Periodontitis + Simvastatin + Propranolol. The stress protocol used was unpredictable chronic stress for 42 days. Weight and behavioral analyzes of y-maze and open field were performed. After euthanasia, microtomographic analysis and histological and histomorphometric analysis were performed. The values obtained were statistically analyzed. It was observed that all medicated groups had greater weight gain than the saline group. In the Simvastatin group and in the Propranolol group, the animals showed greater locomotor activity than in the Saline group. The BP volume was significantly lower in the Simvastatin and Propranolol groups when compared to the saline group. In the histological analysis, it was observed that the area of the lesion was significantly smaller in the animals of the Simvastatin group when compared to the saline solution, as well as lower intensity and extension of the inflammatory infiltrate. Concluding that unpredictable chronic stress increases periapical bone loss in animals with induced AP. In addition, it was concluded that both Simvastatin and Propranolol reduce chronic stress, reducing bone loss in these animals.

Keywords: Apical periodontitis. Chronic stress. Simvastatin. Propranolol. Microtomography.

1 INTRODUÇÃO

A periodontite apical é uma doença associada à infecção de longo prazo do canal radicular, causando uma resposta imune inflamatória dos tecidos periapicais (Siqueira, Rôças, 2007). A interação complexa entre bactérias e a defesa do organismo leva a destruição destes tecidos da região apical (Segura-Egea et al., 2015). Estas lesões podem ser identificadas através da rarefação óssea periapical visível radiograficamente também chamada de periodontite apical (PA). Embora as bactérias por si só agriçam diretamente o tecido periapical, através da liberação de toxinas, a inflamação representa uma resposta imunopatológicas, guiadas por mediadores químicos inflamatórios (Graves et al., 2011; Francisconi et al., 2016).

Os mediadores químicos são conhecidos como citocinas inflamatórias, que são reguladas de acordo com o sistema imunológico do hospedeiro (Jakovljevic et al., 2015). Estes mediadores podem ser pró- inflamatórios ou anti-inflamatórios, de acordo com os receptores atingidos e os mecanismos desencadeados. Além disso, alterações na produção de citocinas são correlacionadas com alterações no sistema RANK/RANKL/OPG que regulam a diferenciação e ativação dos osteoclastos.

O excesso da liberação das citocinas pró-inflamatórias e do aumento da proporção RANKL/OPG no organismo podem dar início ou potencializar a patogênese de diversas doenças que são ativadas e exacerbadas pelos mesmos mediadores inflamatórios no organismo (Brod et al., 1991). Na área da endodontia, diversas alterações sistêmicas com o envolvimento da liberação das mesmas citocinas, estão sendo estudadas em associação as periodontites apicais, como: diabetes (Segura-Egea et al., 2015, 2019; Pérez-Losada et al., 2020), doenças cardiovasculares (Chauhan et al., 2019), osteoporose (Ayed et al., 2018), entre outras. Verifica-se portanto que o aumento da liberação de citocinas inflamatórias nas doenças sistêmicas possui relação com as periodontites apicais. Devido ao aumento de casos de estresse e depressão no mundo moderno, o estudo do envolvimento de doenças psicossociais nas periodontites apicais também se faz necessário.

O estresse é caracterizado por uma ameaça potencial ou real que requer mudanças comportamentais (Joëls, 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., 2014a). Apesar de ser observada a correlação entre o estresse e a progressão das doenças periodontais, na área da endodontia apenas três estudos que avaliam a relação do estresse com as periodontites apicais, sendo que 2 estudos mostram essa relação (Gomes et al., 2019; Khoury et al., 2020; Minhoto et al., 2021).

Khoury et al. (2020) utilizaram modelo de estresse crônico imprevisível e realizaram a indução do estresse quase concomitante a indução da periodontite apical. Além disso, foi analisado apenas um período de eutanásia, de 32 dias. Os autores não observaram uma influência direta do estresse na lesão periapical embora tenham notado uma menor atividade osteoclástica com o uso de uma medicação beta-bloqueadora adrenérgica (propranolol), confirmando a participação do sistema nervoso no metabolismo ósseo (Khoury et al., 2020).

Gomes et al. (2019) utilizaram modelo de estresse crônico previsível mediado pelo condicionamento ao medo, através de uma caixa de condicionamento com choque nos pés dos animais, a indução do estresse teve início quase que concomitante a indução da lesão periapical e o período de análise foi de 56 dias. Os autores verificaram diferença histológica da área da lesão periapical mas não observaram diferença na estrutura óssea através da análise radiográfica, não sendo avaliada a estrutura óssea de forma tridimensional através da microtomografia computadorizada (Gomes et al., 2019).

Embora a influência do estresse sobre a periodontite apical, não tenha sido devidamente comprovada, acredita-se que a divergência de resultados entre os trabalhos existentes se justifique pelas diferenças metodológicas de indução de estresse e no desenho do estudo uma vez que em ambos os estudos os autores induziram a lesão periapical concomitante a indução de estresse.

Considerando que o desenvolvimento de ambas as condições, estresse e periodontite apical, possuem diferentes cinéticas de desenvolvimento, consideramos a importância de estudar o desenvolvimento da periodontite apical em um organismo com quadro de estresse previamente estabelecido. Diante disso, em nosso último trabalho, investigamos o efeito do estresse crônico durante o desenvolvimento da lesão periapical em diferentes períodos de eutanásia. Observamos que após 21 dias da indução da periodontite apical, o volume, bem como a área da lesão periapical é

significativamente maior; o infiltrado inflamatório é predominantemente severo e há maior número de células osteoclásticas na periferia do osso nos animais estressados (Minhoto et al., 2021).

No entanto, sabe-se que a resposta ao estresse é muito complexa uma vez que diversos mediadores químicos relacionados ao estresse têm sido descritos na literatura, incluindo neurotransmissores (por exemplo, noradrenalina e serotonina), peptídeos [por exemplo, hormônio liberador de corticotropina (CRH), outros membros da família CRH e vasopressina] e hormônios esteróides (por exemplo, cortisol em humanos e corticosterona em roedores). Como consequência da existência de múltiplos mediadores, existem também diversos nichos de ação específica para cada mediador e a interação entre eles é que regula a notável capacidade do cérebro de responder, e se adaptar, a um ambiente dinâmico. Segundo Joels e Baram (Joëls, Baram, 2009), o padrão e a magnitude da resposta do hospedeiro frente ao estresse podem ser influenciados por diversos fatores como a duração da exposição ao estresse (agudo ou crônico) e o tipo de estresse (físico, químico ou psicológico). A grande variedade de tipos e contextos de estresse (histórico genético, a idade e sexo do animal estressado) bem como fatores adicionais, como o ponto no ritmo circadiano em que o evento estressante ocorre, podem exercer diferentes efeitos em relação a liberação hormonal e funções imunes, o que reforça a complexidade desse fenômeno fisiológico sobre o organismo e no desenvolvimento de enfermidades (Ostrander et al., 2006; Dumitrescu, 2016).

Na literatura os modelos de estresse variam de acordo com algumas características que se referem à natureza (psicológico, químico ou físico), intensidade (agudo ou crônico) e duração do estresse, podendo, portanto, influenciar nos mediadores que são liberados por diferentes estressores bem como a suas consequências. Trow et al. (2019), propuseram avaliar as diferenças nos comportamentos dos animais submetidos ao estresse crônico previsível e imprevisível. A hipótese testada era de que o estresse imprevisível levaria a um estresse generalizado com alterações comportamentais mais significativas, e que impediriam a adaptação dos animais aos estímulos estressores. Diferente do que eles esperavam, o estresse imprevisível não mostrou um efeito de medo generalizado, diferente do que foi observado no modelo de estresse previsível condicionado por medo. Em vista dessa complexidade os autores ressaltam que o envolvimento de

tantos componentes, bem como a interação entre diferentes mediadores, justifica a variabilidade de distúrbios relacionados ao estresse como depressão, medo e ansiedade (Trow et al., 2019).

Estudos recentes na área da neuroimunologia mostraram que a ação de algumas medicações, como a 3-Hidróxi-3-Metilglutaril- Coenzima A Redutase (estatinas), podem inibir uma série de processos inflamatórios conhecidos por causarem danos cerebrais (Balduini et al., 2003; Chen et al., 2007). Além disso, mostram inibição da ativação da micróglia e astrócitos após injúrias como o estresse (Lindberg et al., 2005). As estatinas são uma classe de agentes redutores de colesterol utilizadas para tratamento de dislipidemia e redução do risco de doenças cardiovasculares (Lei et al., 2014). A administração desta substância tem mostrado atenuar comportamentos depressivos por meio da inibição da ativação da micróglia com diminuição da liberação de citocinas inflamatórias, por meio da inibição da via RANK/RANKL/OPG (Yu et al., 2019).

Yu et al. (2019) concluíram também que a administração de 20mg/kg/dia de Sinvastatina em animais preveniu o comportamento depressivo, além de prevenir a neuroinflamação induzida pelo estresse crônico, pela supressão da atividade da micróglia e levando a diminuição da liberação de citocinas pró inflamatórias (Yu et al., 2019).

Durante esta última década, diversos são os estudos que mostram uma correlação do efeito da Sinvastatina no combate ao distúrbio de ansiedade, depressão e estresse (Shadmehr, Khademi, 2013; ElBatsh, 2015; Naserzadeh et al., 2019). Shadmehr e Khademi em 2013 mostraram que a Sinvastatina tem o potencial de redução da expressão de RANKL e o aumento da expressão de OPG em lesões periapicais induzidas em ratos (Shadmehr, Khademi, 2013). Sendo assim, este fármaco alia sua ação anti-inflamatória à ação antidepressiva e sobre o estresse (Yokoyama et al., 2004; Abeles, Pillinger, 2006). Kwan et al. (2014) realizaram um estudo com a finalidade de observar seu efeito antidepressivo e de controle da ansiedade em ratos. Observaram que após 4 semanas os animais encontravam-se estressados, o que foi comprovado por meio da análise comportamental. Entretanto, estas alterações comportamentais foram revertidas através da administração de Sinvastatina, sugerindo que esta medicação possui resultados semelhantes aos antidepressivos (Kwan et al., 2009).

ElBatsh (2015) avaliou o efeito antidepressivo da Sinvastatina em animais diabéticos, que apresentavam alterações comportamentais como, maior tempo de imobilidade; este efeito foi revertido pela ação da Sinvastatina. Além disso, mostrou redução nos níveis sanguíneos de corticosterona. Concluiu-se que esta medicação tem ação antidepressiva em ratos diabéticos, através das alterações sanguíneas de corticosterona e de serotonina no hipocampo (ElBatsh, 2015). Em outro trabalho, observou-se através de estudo comportamental de natação forçada que os animais apresentaram comportamento depressivo quando expostos ao traumatismo craniano, este estado foi revertido através da administração da sinvastatina intraperitoneal diária (Lim et al., 2017). Além destes efeitos sobre o estresse, estudos mostram que a sinvastatina tem potencial anti-inflamatório e na modulação do sistema imunológico (Yokoyama et al., 2004; Abeles, Pillinger, 2006).

Referente a dosagem de Sinvastatina utilizada em ratos, a literatura mostra a dosagem variando desde 1 até 20 mg/kg/dia, mostrando os melhores resultados com a dosagem de 20 mg/kg/dia tanto para os efeitos anti reabsortivos como antidepressivos.

Uma possível via de ativação da micróglia induzida pelo estresse se dá pela ativação destas células pela recepção de sinais noradrenérgicos no cérebro de animais estressado, que por sua vez tem a liberação aumentada de hormônios adrenérgicos, principalmente, a noradrenalina. Os estudos mostram que o estresse pode ser bloqueado pela administração de um betabloqueador adrenérgico, como o propranolol (Blandino et al., 2006; Wohleb et al., 2011), que por sua vez, também inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias em células da micróglia (Wang et al., 2010).

Diversos estudos mostram a eficácia da utilização de betabloqueador adrenérgico (Propranolol) no tratamento de indivíduos estressados com a finalidade de diminuir a progressão da perda óssea. Logo, estes estudos comprovam a indução da perda óssea aumentada em indivíduos estressados a partir do sistema nervoso simpático (Yirmiya et al., 2006; Lu et al., 2014a; Haffner-Luntzer et al., 2019a). Entretanto, os estudos que utilizam o beta bloqueador adrenérgico (propranolol) utilizam dosagens muito variadas. A partir do levantamento bibliográfico das doses utilizadas verificou-se que a dosagem que mostra controle da perda óssea corresponde a de até 1mg/kg/dia. Khoury et al. em 2020, apesar de ser o único trabalho na endodontia que avalia a utilização do propranolol com a finalidade de

retardar a perda óssea nas periodontites apicais, verificaram uma tendência a diminuir o número de células osteoclásticas dos animais estressados que receberam administração de propranolol (Khoury et al., 2020). No entanto, estes autores utilizaram a dosagem de 0,1mg/kg/dia.

Nesse contexto, justificamos o presente estudo diante da necessidade de dar continuidade na nossa linha de pesquisa, que avalia a relação entre o estresse e a progressão da lesão periapical uma vez que fatores estressores de âmbito psicológico e emocional, como o pânico, a ansiedade e depressão estão cada vez mais presentes na vida humana moderna. Portanto, com base nos estudos citados e na experiência adquirida em nossos estudos prévios, avaliaremos os efeitos do estresse sobre as lesões periapicais através da análise de diferentes metodologias de indução de estresse. Além disso, avaliaremos a ação antidepressiva e antirreabsortiva de duas medicações, Sinvastatina, Propranolol, e sua associação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Modelos de indução de estresse crônico em ratos

Em 2001 Haile et al. realizaram um estudo para avaliar os efeitos do estresse crônico imprevisível e do estresse crônico previsível na atividade locomotora de ratos submetidos a baixas doses de cocaína. Os ratos foram expostos a 10 dias de estresse crônico imprevisível, ou estresse crônico previsível, ou ainda, não foram estressados. A atividade locomotora foi avaliada por 4 dias, tendo início um dia antes de cessar o estresse crônico. A partir dos resultados, puderam observar que o estresse crônico imprevisível, mas não o previsível aumentaram os efeitos da cocaína na atividade locomotora dos animais (Haile et al., 2001).

Buscando avaliar o efeito do estresse crônico na resposta imune adaptativa, Thakur et al. (2017) realizaram um trabalho, no qual utilizou-se ratos Wistar machos que foram expostos a dois tipos de protocolo de estresse diferentes. Um grupo foi exposto ao estresse crônico previsível e o outro ao estresse crônico imprevisível por 14 dias consecutivos. O estresse previsível foi realizado através da imobilização do animal por um período de 1 hora por dia, já o estresse imprevisível foi composto de diferentes tipos de estressores, como imobilização, choque nos pés, exposição ao frio, privação de água e comida e isolamento social. Realizou-se a análise imunológica através de marcadores de IgG específicos de KLH. A partir dos resultados observou-se que em ambos os protocolos de estresse crônico houve supressão da resposta imune humoral (Thakur et al., 2017).

Buscando avaliar o efeito do estresse crônico imprevisível em ratos Wistar machos na ansiedade e depressão, Koprdoval et al. (2016) induziram estresse crônico imprevisível através da aplicação de diferentes estressores psicossociais, físicos e metabólicos por duas semanas, para comparar o efeito da administração de Venlafaxina e diazepam. Após a finalização do estímulo estressor, no décimo quarto dia, foram realizadas análises comportamentais com a finalidade de avaliar atividade motora, cognição e comportamento do tipo ansiedade e depressão. Além destas análises foi mensurada o nível de corticosterona sérica. Observou-se que os níveis de

corticoesterona sérica aumentaram significativamente em relação ao grupo controle, nos testes comportamentais também foi observado maior característica de ansiedade e depressão nos animais (Koprđová et al., 2016).

Um estudo antigo de 1988, realizado por Adell, Trullas e Gelpi, avaliaram os efeitos do choque previsível e imprevisível nas concentrações de serotonina e noradrenalina em 7 regiões do cérebro de ratos. O experimento foi realizado em dois períodos, 2 minutos e 30 minutos após a exposição ao choque. O choque imprevisível esgotou os níveis de noradrenalina em quase todas as regiões do cérebro. No entanto, em 2h pós estresse a noradrenalina aumentou significativamente em comparação aos grupos controles e em ratos previsivelmente estressados. Já o hormônio secretador da serotonina aumentou significativamente 30 minutos após o estresse nos ratos estressados previsivelmente. Em relação ao estresse imprevisível percebeu-se que ambos parâmetros demoravam mais para retornar ao normal. Sugerindo então, que o choque imprevisível é percebido como uma situação que causa mais ansiedade nos animais (Adell et al., 1988).

Zucchi et al. (2009) compararam o efeito do estresse crônico de contenção previsível e o estresse crônico variável imprevisível na recuperação motora após lesão focal no córtex motor do rato. Os resultados mostraram padrão distinto de recuperação, animais expostos ao estresse previsível tiveram sucesso de alcance significativamente menor tanto no momento pré quanto após lesão. Em geral, o estresse previsível de contenção gerou deficiências motoras mais pronunciadas antes e após a lesão do que o estresse variável. Por outro lado o estresse variável melhorou a precisão do posicionamento do membro quando comparado ao controle. Concluindo que ambos os estresses influenciam no curso da recuperação após acidente vascular cerebral (Zucchi et al., 2009).

Trow et al. (2019) investigaram diversas questões relacionadas ao estresse e ao aprendizado. O Objetivo principal era determinar se o estresse imprevisível poderia promover respostas de medo generalizadas mais que o estresse previsível, o segundo objetivo era avaliar como o estresse repetido pode influenciar a capacidade de um rato de aprender. Para isto, dois grupos de ratos receberam estresse de contenção de 14 dias com um grupo sendo previsível e o outro imprevisível. Após estas manipulações ambos os grupos receberam um período de recuperação e em seguida uma avaliação do comportamento discriminativo baseada no medo. Observou-se que

o estresse imprevisível facilitou a expressão comportamental do medo no primeiro ciclo. Após dois ciclos de recuperação de estresse, o grupo imprevisível apresentou congelamento discriminativo, enquanto surpreendentemente, o grupo previsível não exibiu congelamento diferenciado. Sugerindo que o estresse crônico imprevisível promoveu o comportamento de medo na presença de um contexto ameaçador, enquanto o medo generalizado é causado pelo estresse previsível repetido (Trow et al., 2019).

2.2 Ação da Sinvastatina na perda óssea e no estresse crônico em ratos

Com o objetivo de avaliar o papel das estatinas no tratamento da depressão, em 2019, (Yu et al., 2019), avaliaram os efeitos no comportamento depressivos e neuroinflamação em modelos de indução de estresse por lipopolissacarídeos e estresse crônico em camundongos. Foram realizados testes comportamentais como, preferência pela sacarose, teste de natação forçada, teste de alimentação suprimida por novidade. Foi detectada a atividade microglial pela análise imuno-histoquímica e as expressões de citocinas pró-inflamatórias foram examinadas por Western Blot. Observou-se que a administração oral de sinvastatina a 20 mg/kg preveniu e melhorou comportamentos depressivos, bem como melhorou a neuroinflamação induzida por LPS e CMS. Mostrando que a sinvastatina tem potencial para ser empregada em terapia associada de depressão e neuroinflamação.

Em 2014, (Lin et al., 2014), realizaram um estudo com o objetivo de examinar efeitos antidepressivos das estatinas em ratos expostos ao estresse crônico leve. Observou-se que após 4 semanas de exposição ao estresse crônico os animais desenvolveram estado semelhante ao depressivo demonstrado pelo teste de natação forçada e de preferência pela sacarose. No entanto esses comportamentos foram revertidos pelo uso da sinvastatina 5 ou 10 mg/kg/dia por 14 dias. Os comportamentos de ansiedade e de atividade locomotora não foram alterados pelo estresse crônico leve. Concluindo que as estatinas tem potencial efeito antidepressivo.

Kilic et al. (2012) avaliaram o efeito antidepressivo e ansiolítico da sinvastatina em ratos. Foram utilizados 64 ratos, os quais foram avaliados por meio do nado

forçado e do labirinto em cruz para testar os efeitos antidepressivos e ansiolíticos. Os períodos de imobilidade foram diminuídos significativamente em todos os grupos, independente da dose de sinvastatina. Concluiu-se que a sinvastatina apresenta efeitos antidepressivos e ansiolíticos significativos em ratos, semelhante aos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (Kilic et al., 2012).

Segundo ElBatash. (2015), a diabetes traz alterações hormonais e neuroquímicas, favorecendo o aparecimento de ansiedade e depressão. Portanto realizou-se um estudo para investigar a utilização da sinvastatina em ratos diabéticos. Os resultados mostraram que os ratos diabéticos tiveram maior tempo de imobilidade do que os ratos do grupo controle, a utilização da sinvastatina diminui esse comportamento do tipo depressivo em ratos. Concluindo-se que a sinvastatina exerce um efeito antidepressivo em ratos diabéticos (ElBatsh, 2015).

Santos et al. (2012) realizaram um estudo para avaliar interações sinérgicas entre a sinvastatina e a fluoxetina que é um inibidor seletivo da recaptação da serotonina e muito utilizada no tratamento de depressão. Os resultados indicaram que o tratamento com sinvastatina e/ou fluoxetina reduz comportamentos do tipo ansiedade nos testes de labirinto em cruz elevado e campo aberto. Os resultados também mostraram um aumento significativo na atividade de natação durante o teste de natação forçada, com um aumento concomitante no tempo de escalada apenas nos animais tratados com sinvastatina. Indicando que a fluoxetina e a sinvastatina apresentam efeito antidepressivo por mecanismos semelhantes (Santos et al., 2012).

Naserzadeh et al. (2019), realizaram um estudo que teve como objetivo investigar a potencial atividade antidepressiva da sinvastatina, usando teste de natação forçada em camundongos. Além disso, a interação entre sinvastatina e fluoxetina como medicamento de referência foi examinada. Após avaliação do comportamento locomotor no teste de campo aberto, o teste de natação forçada foi aplicado para avaliar o comportamento. A sinvastatina em doses de 20, 30 e 40 foi administrada 30 min antes dos testes comportamentais. O tempo de imobilidade foi significativamente diminuído após a injeção de sinvastatina, bem como houve a redução do tempo de imobilidade no teste de natação forçada. Além disso, a sinvastatina potencializou o efeito antidepressivo da fluoxetina (Naserzadeh et al., 2019).

Quadro 1 - Levantamento das dosagens de Sinvastatina utilizadas nos estudos em animais e os seus resultados

Revista	Autor	Ano	Dosagem	Resultado
J. affect disord	(Yu et al., 2019)	2019	20 mg/kg/dia	melhora características depressiva
Neuropsychiatr Dis Treat	(Santos et al., 2012)	2012	1 ou 10 mg/kg	10 mg/kg com 10 mg/ kg de fluoxetina - melhora da depressão
Neurosciences (Riyadh)	(Kilic et al., 2012)	2012	10/30/50mg/kg	doses de 10 e 30 mg/kg mostraram resultados antidepressivos
JOE	(Lin et al., 2009)	2009	20 mg/kg/dia	Efeito antireabsortivo da sinvastatina na LP
JOE	(Hua et al., 2012)	2012	20 mg/kg/dia	Efeito antireabsortivo da sinvastatina na LP
IEJ	(Yang et al., 2019)	2019	20 mg/kg/dia	Efeito antireabsortivo em LP
IEJ	(Shadmehr and Khademi, 2013)	2013	20 mg/kg/dia	Efeito antireabsortivo da sinvastatina na LP
Neurocrit Care	(Lim et al., 2017)	2017	4/10/20mg/kg	20mg/kg diminuiu efeitos depressivos

Fonte: Elaborada pelo autor

2.3 Utilização de bloqueadores adrenérgicos no estresse crônico em ratos

Yirmiya et al. (2006) induziram estresse crônico em camundongos, levando-os a um quadro de depressão, estes animais exibiram depressão comportamental, acompanhada de massa e estrutura óssea prejudicada, observadas por diminuição da densidade do volume ósseo trabecular e número trabecular. A análise de remodelação óssea revelou que a deficiência esquelética induzida por estresse crônico é acompanhada por formação óssea restrita devido a redução do número de osteoblastos. O estudo observou que a perda óssea desencadeada pela depressão está associada a um aumento substancial nos níveis de norepinefrina óssea e pode ser bloqueada pelo antagonista beta-adrenérgico, sugerindo que o sistema nervoso simpático medeia os efeitos esqueléticos da depressão induzida pelo estresse (Yirmiya et al., 2006).

Um estudo realizado por Okada et al. (2010), investigou-se os efeitos do betabloqueador (propranolol) na perda óssea alveolar induzida pela infecção por *P. gingivalis*. Utilizaram ratos da linhagem Sprague-Dawley, que foram subdivididos da seguinte forma: solução salina, propranolol, salina com *P. gingivalis*, e propranolol com *P. gingivalis*. A perda óssea alveolar horizontal foi avaliada medindo a junção cemento-esmalte e a crista óssea alveolar. A partir dos resultados observou-se que o bloqueio de beta receptores no tecido periodontal pelo propranolol inibiu a diferenciação osteoclástica e preveniu a perda óssea alveolar induzida pela infecção por *P. gingivalis*. Concluiu-se que o sistema nervoso simpático está envolvido no desenvolvimento da periodontite e sugerem que a modulação do sistema nervoso simpático com betabloqueadores possibilita o controle do metabolismo da massa óssea alveolar (Okada et al., 2010).

Lu et al. (2014) realizaram um estudo com a finalidade de avaliar os papéis do estresse crônico na estimulação do sistema nervoso simpático e explorou os mecanismos subjacentes da periodontite. Os resultados deste trabalho, mostraram que a periodontite em condições de estresse crônico aumentou a expressão de TH, $\alpha 1$ -AR e $\beta 2$ -AR. A fentolamina reduziu significativamente os níveis de citocinas inflamatórias. Além disso, foi observada uma diminuição acentuada na proliferação de HPDLF e aumento da expressão de $\alpha 1$ -AR após o tratamento com LPS. Os

resultados sugerem que o estresse crônico podem aumentar significativamente a progressão patológica da periodontite por uma via inflamatória mediada por sinalização alfa adrenérgica (Lu et al., 2014b).

Khoury et al. (2019) com o objetivo de investigar a influência do estresse crônico e do bloqueio adrenérgico em um modelo de periodontite apical em ratos. Para isto, foram utilizados trinta e dois ratos da linhagem Wistar que foram submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível. Foi realizada a indução da lesão periapical e os grupos foram divididos em, sem estresse, com estresse e solução salina, com estresse e utilização de beta bloqueador adrenérgico (propranolol), estresse alfa bloqueador adrenérgico. Observou-se que o grupo solução salina apresentou níveis de corticosterona significativamente maiores que o grupo não estressado. Todos os grupos apresentaram lesões periapicais de volume semelhante, infiltrado inflamatório semelhante e níveis de citocinas semelhantes. Entretanto, o número de células TRAP-positivas diminuiu significativamente nos grupos que receberam injeções diárias de bloqueadores adrenérgicos. Concluiu-se que a administração de bloqueadores adrenérgicos não foi capaz de modular a resposta inflamatória, mas apresentou efetividade na redução do número de osteoclastos na região periapical (Khoury et al., 2020).

Quadro 2 - Levantamento das dosagens de Propranolol utilizadas nos estudos em animais e os seus resultados

Revista	Autor	Ano	Dosagem	Resultado
BrJ Pharmacol	(Rodrigues et al., 2012)	2012	0,1/5/20 mg/kg/dia	Apenas a dosagem de 0,1mg/kg reduziu reabsorção óssea e redução de citocinas inflamatórias na doença periodontal
Proc Natl Acad Sci U S A	(Yirmiya et al., 2006)	2006	0,4mg/dia	A depressão aumenta risco de fratura de osso e que o uso do propranolol pode reverter esse quadro
Proc Natl Acad Sci U S A.	(Haffner-Luntzer et al., 2019b)	2019	10mg/kg	A administração de propranolol previne a reabsorção óssea causada por estresse
Arch Oral Biol	(Okada et al., 2010)	2010	1mg/kg	A utilização de beta bloqueador controlou a perda óssea periodontal em ratos estressados
Arch Oral Biol	(Khoury et al., 2020)	2020	0,1mg/kg	A utilização de propranolol diminui a contagem de osteoclastos
Exp Mol Med.	(Lu et al., 2014b)	2014	0,1mg/kg	Houve diminuição da perda óssea.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram:

Parte 1- Analisar os efeitos da indução de estresse crônico, previsível e imprevisível no desenvolvimento da periodontite apical.

Parte 2- Analisar os efeitos de medicações sistêmicas, que apresentam características antidepressivas, na reabsorção óssea periapical durante a indução da periodontite apical em ratos sob indução do melhor protocolo de estresse. As medicações utilizadas foram: Sinvastatina, Propranolol e a associação de Sinvastatina com propranolol.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parte 1

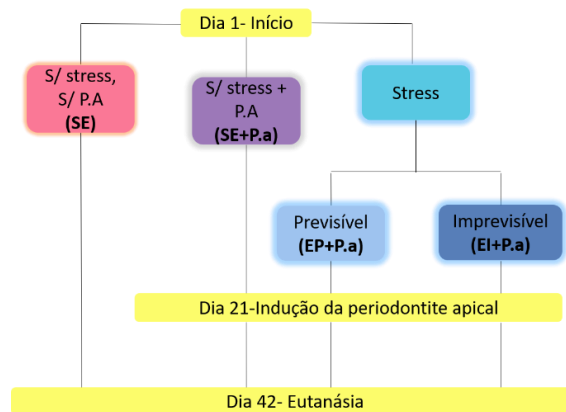
4.1.1 Animais

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (CEPa) do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – ICT-UNESP (anexo). O cálculo amostral para este trabalho foi realizado baseado no estudo de (Castro et al., 2020). Considerando um erro alfa de 0,05 e um erro beta de 0,20, um número mínimo de oito animais por grupo foi considerado necessário. Para esta etapa do trabalho foram utilizados 32 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e durante o experimento foram alojados no biotério do ICT- UNESP. Utilizou-se animais com noventa dias de idade, mantidos em gaiolas em temperatura ambiente e alimentados com ração e água ad libitum.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (N=8) (Figura 1)

- Sem estresse, sem periodontite apical, (SE);
- Sem estresse, com periodontite apical (SE+Pa);
- Estresse previsível + periodontite apical (EP+Pa);
- Estresse imprevisível + periodontite apical (EI+Pa).

Figura 1 - Organograma dos grupos parte 1



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2 Indução do estresse crônico

Nos grupos estresse (EP+P.a e EI+P.a) a indução do estresse crônico teve início 21 dias antes da indução da lesão periapical. No grupo EP+P.a a indução do estresse previsível foi realizada de acordo com o protocolo de Gomes et al. (2019), utilizando de uma câmara de (37 cm x 25 cm x 21 cm, Skinner Box, ELT-02, Eltrones, Joinville, SC, BR), que consiste em uma caixa de acrílico com barras metálicas por onde passam correntes elétricas. Os animais foram colocados sobre essas barras durante cada sessão de estresse de maneira individual. Os animais receberam diariamente, no período entre 8:30 às 10:30h um estímulo condicionado neutro (som com duração de dois segundos) antes do choque de 1,10 mA. Seis choques foram realizados com intervalo de 25 segundos. A metodologia foi realizada em sala separada, com um animal por vez, para evitar que os demais animais ouvissem os ruídos do animal do grupo experimental. A câmara foi limpa com etanol 70% antes e depois do uso (Figura 2).

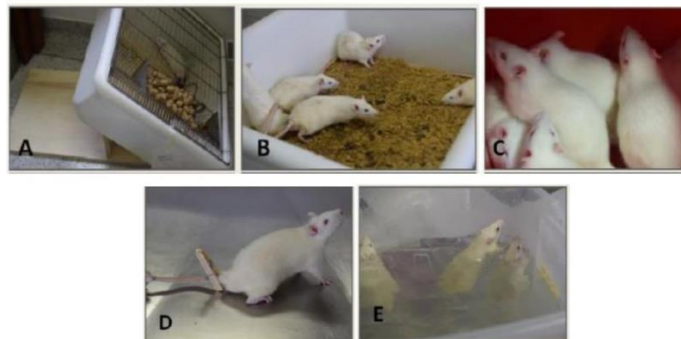
Figura 2 - Indução do estresse crônico previsível: animais dentro da Skinner box



Fonte: Elaborada pelo autor.

No grupo EI+P.a foi realizado o estresse crônico imprevisível conforme protocolo já estabelecido na literatura (Khoury et al., 2020; Minhoto et al., 2021). Foi realizado diariamente das 8:30h às 10:30h e 16:30h às 18:30h. Este protocolo consiste semanalmente em: dois períodos de privação de alimentos ou de privação de água; dois períodos de inclinação em 45° da gaiola; dois períodos de sujidade da gaiola (250 ml de água na serragem); dois períodos de exposição a luz estroboscópica (2 horas); dois períodos natação em 4°C ou 45°C (5 min); dois períodos de aperto cauda (1min); e dois períodos de nenhum estresse (Figura 3).

Figura 3 - Ilustração do protocolo de estresse crônico imprevisível

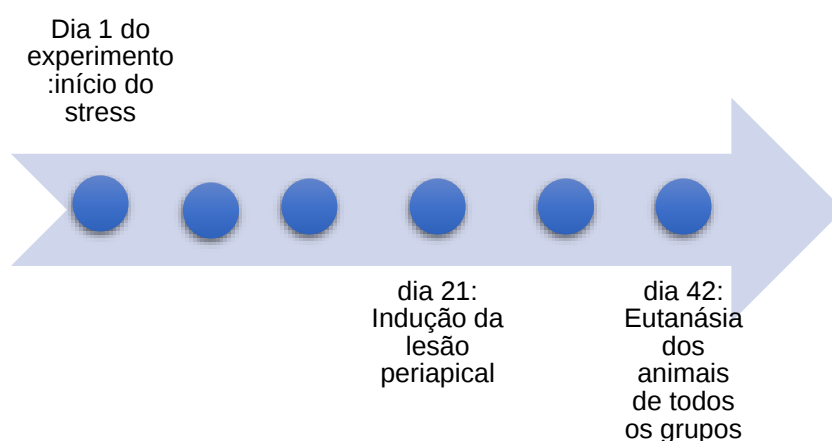


Legenda: a) Inclinação da gaiola à 45°; b) Sujidade da gaiola; c) Luz estroboscópica; d) Aperto caudal; e) natação 4° e a 45°.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Ambos os grupos estressados permaneceram sob indução de estresse crônico 42 dias do experimento, na sequência foi realizada a eutanásia de todos os animais (Figura 4).

Figura 4 - Sequência cronológica da indução do estresse e da periapicopatia



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.3 Indução da periapicopatia

Os procedimentos de indução da necrose pulpar foram realizados em sala cuidadosamente limpa, utilizando-se álcool 70%, e com instrumentais devidamente esterilizados. O cirurgião e auxiliares utilizaram equipamento de proteção individual. Para anestesia geral, foi usada solução de 10mg/Kg de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompun- Bayer do Brasil), e 100mg/Kg de Ketamina base (Dopalen – Agribands do Brasil Ltda), via intramuscular. Foi realizada a antisepsia da porção posterior da mandíbula do lado direito com Solução de clorexidina a 2%. Para a indução de necrose pulpar foi utilizado o protocolo proposto por (Scarparo et al., 2012). As polpas dentais de todos os primeiros molares, superiores e inferiores foram expostas. Foi realizada abertura na fossa distal, situada mesialmente à cúspide distal na face oclusal com brocas esféricas em alta rotação # 1011 HL (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.

As cavidades ficaram expostas ao meio bucal pelo período de 21 dias com objetivo de induzir a contaminação bacteriana e consequente lesão periapical inflamatória (Figura 6), de acordo com um estudo prévio realizado pelo nosso grupo, que demonstrou que o estágio de 21 dias do desenvolvimento da lesão periapical é o ideal para análise do efeito do estresse na periodontite apical (Minhoto et al., 2021).

Figura 6 – 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.

4.1.4 Avaliação comportamental da indução do estresse crônico

Todos os animais foram trazidos para a sala de experimento 30 minutos antes dos testes comportamentais e que foram realizados com o princípio de duplo-cego. Todos os animais passaram pelo teste comportamental de acordo com a seguinte ordem:

Peso corporal: Foi realizada pesagem dos animais previamente ao início da indução de estresse, após 21 dias e após 42 dias (no momento da eutanásia);

Teste de campo aberto (Open Field Test): Foi utilizado um dispositivo de acrílico de 80cm x 80 cm x 40 cm com o fundo da caixa dividido em quadrados equiláterais. Os ratos foram colocados no centro do campo aberto. Registrou-se o número de quadrados cruzados pelos animais, a movimentação do animal horizontalmente (quatro patas dentro de um quadrado). Os animais ficaram por 1 minuto para adaptação ao ambiente e após este período foi realizada a análise por 3 minutos.

Labirinto em Y: Foi utilizado um dispositivo de acrílico em formato de Y com três braços com as seguintes medidas: 45 X 35 X 12cm. Os animais foram colocados um por vez na área de intersecção dos três braços, permitindo que o animal tomasse decisões sobre o trajeto percorrido. Este teste foi utilizado para analisar se a capacidade exploratória do animal estava alterada. O número de entradas do animal nos “braços” do Y foi contado sendo que uma entrada exige que ambas as patas traseiras atravessassem totalmente a linha divisória da entrada do braço (Figura 5).

Figura 5 – Ilustração dos testes de análise comportamental



Legenda: a) Pesagem dos animais; b) Teste de campo aberto (Open Field Test); c) Labirinto em Y;

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.5 Eutanásia

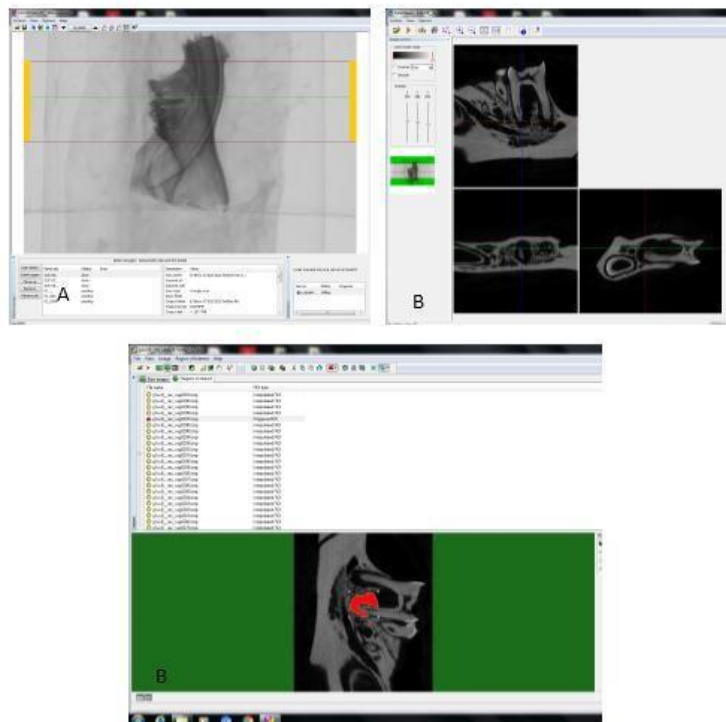
Os animais foram anestesiados, sendo utilizados os mesmos anestésicos do procedimento cirúrgico, logo em seguida foram eutanasiados na guilhotina. As hemimandíbulas do lado direito, foram removidas, dissecadas e fixadas em solução de formol a 10% durante o tempo mínimo de 48 h. A outra metade foi removida, dissecada e armazenada por no máximo 48h para posterior realização da microtomografia computadorizada.

4.1.6 Análise microtomográfica da lesão periapical

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, possibilitando a estabilização a fim de prevenir qualquer tipo de movimentação durante o escaneamento e mantendo a umidade da peça. Para realização da análise microtomográfica foi utilizado um aparelho modelo 1174 da fabricante SkyScan® (SkyScan 1174 in vivo, Skyscan, Kontich, Belgium). O escaneamento das amostras foi padronizado com um tamanho de voxel isotrópico de 18µm, 50kV, 500µA, em 180º, 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 0.5mm 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. 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 línguo 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. Seleccionados os parâmetros de interesse, os resultados apareceram em uma tabela contendo cada parâmetro calculado pelo CTAnalyser e sua respectiva unidade de medida (Figura 7). 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 - 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.

4.1.7 Análise histológica e histomorfométrica

As hemi-mandíbulas direitas de cada grupo foram desmineralizadas em solução de EDTA (etilenodinitrilotetracético – TITRIPLEX III- Merck) por 4 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 por dois examinadores calibrados.

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

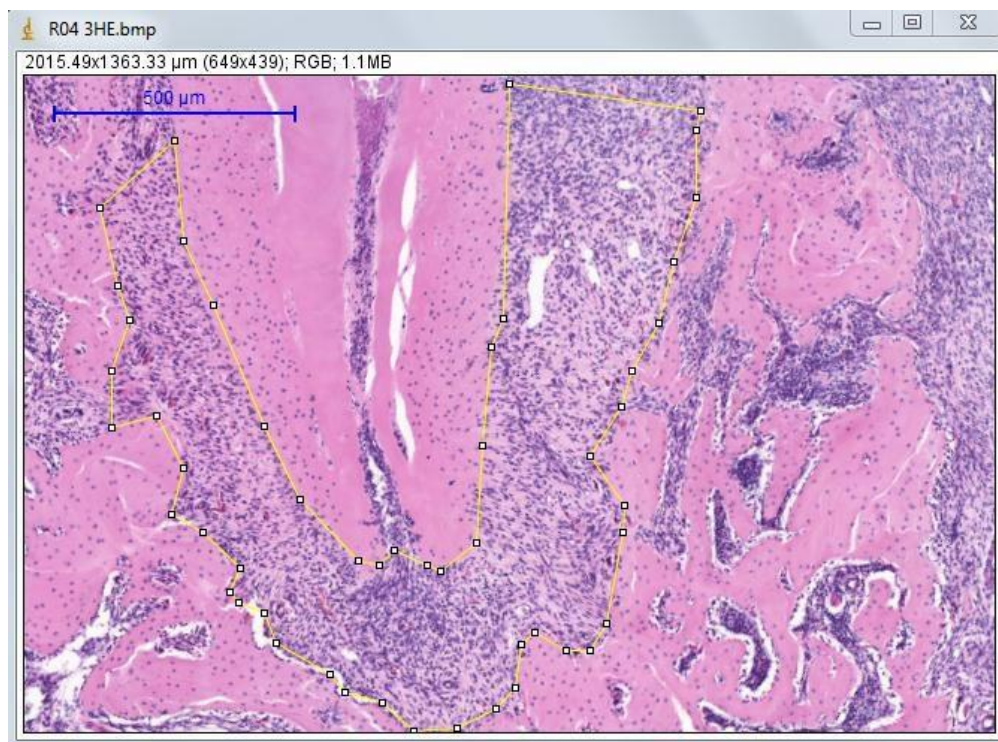
A intensidade do infiltrado inflamatório foi classificada através de scores sendo: score 1 (0 a 25 células inflamatórias); score 2 (25 a 50 células inflamatórias); score 3 (50 a 75 células inflamatórias); score 4 (acima de 75 células inflamatórias) (Cintra et al., 2014).

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) (Cintra et al., 2014). (Figura 8).

A área de lesão periapical associada ao terço apical da raiz distal do primeiro molar mandibular foi medida pelo software Image J (Domínio Público). 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 8 – Avaliação da área 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.

4.1.8 Análise estatística

Os dados obtidos nos testes paramétricos foram registrados e apresentados através da média e desvio padrão observados. A comparação entre os grupos SE e SE+P.a foi realizada pelo teste t de student, já a comparação entre os diferentes protocolos de estresse foi realizada pelo teste Anova um fator ($p < 0,05$). Todos os testes estatísticos foram realizados no software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., California, EUA).

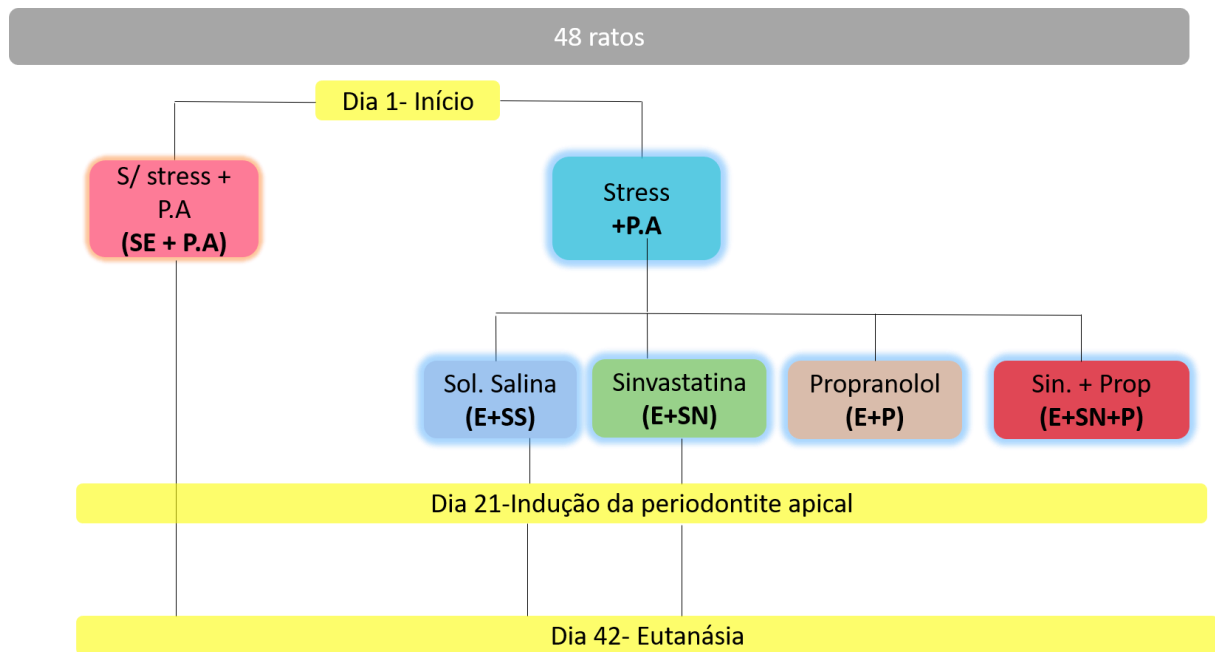
4.2 Parte 2

4.2.1 Animais

O cálculo amostral para este trabalho foi realizado baseado no estudo de (Castro et al., 2020). Considerando um erro alfa de 0,05 e um erro beta de 0,20, um número mínimo de oito animais por grupo foi considerado necessário. Para esta etapa do trabalho foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e durante o experimento foram alojados no biotério do ICT- UNESP. Utilizamos animais com noventa dias de idade, mantidos em gaiolas em temperatura ambiente e alimentados com ração e água ad libitum. Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos (N=8) (Figura 9). A linha do tempo dos procedimentos experimentais em vivo também foram ilustrados na figura 10.

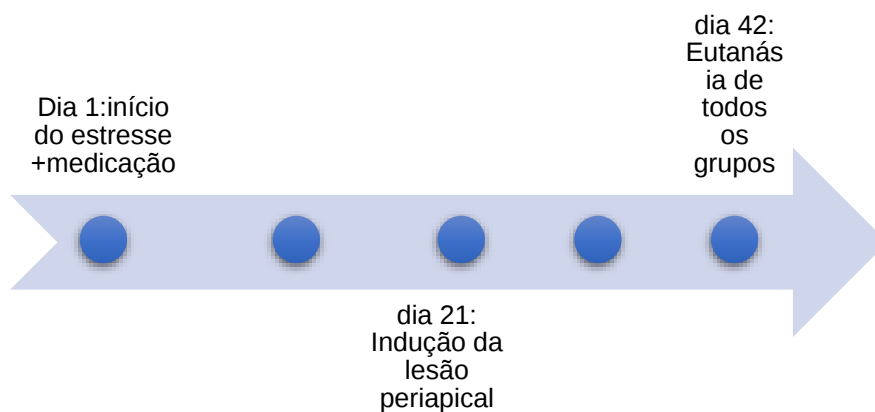
- Sem estresse + periodontite apical (SE + P.a);
- Periodontite apical + Estresse + Solução salina (E+SS);
- Periodontite apical + Estresse + Sinvastatina (E+SN);
- Periodontite apical + Estresse + Propranolol (E+P)
- Periodontite apical + Estresse + Sinvastatina + Propranolol (E+SN+P)

Figura 9 – Organograma dos grupos parte 2



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10 - Sequência cronológica da indução do estresse, da periapicopatia e da utilização da medicação



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.2 Administração das medicações

A administração da Sinvastatina e do Propranolol teve início juntamente a indução do estresse crônico, e foi administrada através de uma cânula para gavagem. O grupo sem estresse, sem lesão (SE) não recebeu nenhuma medicação, o grupo estressado com solução salina (E+SS) receberam diariamente a administração de solução salina estéril. O grupo, com lesão + estresse + sinvastatina (E+SN), recebeu diariamente a dosagem de 20 mg por/kg/dia de Sinvastatina até o final do experimento. A dosagem da medicação segue o protocolo utilizado por Shadmer e Khademi em 2013. O grupo lesão + estresse + propranolol (E+P) recebeu diariamente a dose de 0,1 mg/kg/dia de propranolol duas vezes ao dia. O grupo lesão + estresse + sinvastatina + propranolol (E+SN+P) recebeu diariamente a dose de 20 mg/kg/dia de Sinvastatina no período da manhã mais a administração de 0,1 mg/kg/dia de propranolol duas vezes ao dia. Ambas as dosagens foram estabelecidas a partir de um levantamento da literatura que pode ser observado no Quadro 1 e no Quadro 2. Todas as soluções foram administradas via oral, através de cânula de gavagem, do início até o final do experimento.

4.2.3 Indução do estresse crônico

A metodologia de estresse que foi utilizada nesta etapa do trabalho foi escolhida de acordo com os resultados obtidos na parte 1 e teve início 21 dias antes da indução da lesão periapical, permanecendo por mais 21 dias, até o momento da eutanásia.

4.2.4 Indução da periapicopatia e eutanásia

A indução da periapicopatia e o procedimento de eutanásia ocorreram da mesma maneira como descrito na parte 1 deste estudo.

4.2.5 Avaliação comportamental da indução do estresse crônico

Todos os animais foram trazidos para a sala de experimento 30 minutos antes dos testes comportamentais e que foram realizados com o princípio de duplo-cego. Todos os animais passaram pelo teste comportamental de acordo com a seguinte ordem:

Peso corporal: Foi realizada pesagem dos animais previamente ao início da indução de estresse, após 21 dias e após 42 dias (no momento da eutanásia);

Teste de campo aberto (Open Field Test): Foi utilizado um dispositivo de acrílico de 80cm x 80 cm x 40 cm com o fundo da caixa dividido em quadrados equiláteros. Os ratos foram colocados no centro do campo aberto. Registrou-se o número de quadrados cruzados pelos animais, a movimentação do animal horizontalmente (quatro patas dentro de um quadrado). Os animais ficaram por 1 minuto para adaptação ao ambiente e após este período foi realizada a análise por 3 minutos.

Labirinto em Y: Foi utilizado um dispositivo de acrílico em formato de Y com três braços com as seguintes medidas: 45 X 35 X 12cm. Os animais foram colocados um por vez na área de intersecção dos três braços, permitindo que o animal tomasse decisões sobre o trajeto percorrido. Este teste foi utilizado para analisar se a capacidade exploratória do animal estava alterada. O número de entradas do animal nos “braços” do Y foi contado sendo que uma entrada exige que ambas as patas traseiras atravessassem totalmente a linha divisória da entrada do braço.

4.2.6 Análise microtomográfica da região periapical

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, possibilitando a estabilização a fim de prevenir qualquer tipo de movimentação durante o escaneamento e mantendo a umidade da peça. Para realização da análise microtomográfica foi utilizado um aparelho modelo 1174 da fabricante SkyScan® (SkyScan 1174 in vivo, Skyscan, Kontich, Belgium). 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. 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®). 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 línguo 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.

4.2.7 Análise histológica e histomorfométrica

As hemi-mandíbulas direitas 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 Canom, 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 morfológicamente e quantitativamente quanto à presença da lesão periapical e extensão da lesão periapical. As análises foram realizadas por dois examinadores calibrados 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).

A área de lesão periapical associada ao terço apical da raiz distal do primeiro molar mandibular foi medida pelo software Image J (Domínio Público). 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.

4.2.8 Análise estatística

Os dados obtidos nos testes paramétricos foram registrados e apresentados através da média e desvio padrão observados. A comparação entre os grupos SE+P.a e E+SS foi realizada pelo teste t de student, já a comparação entre as diferentes medicações foi realizada pelo teste ANOVA um fator ($p < 0,05$). Todos os testes estatísticos foram realizados no software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., California, EUA).

5 RESULTADOS

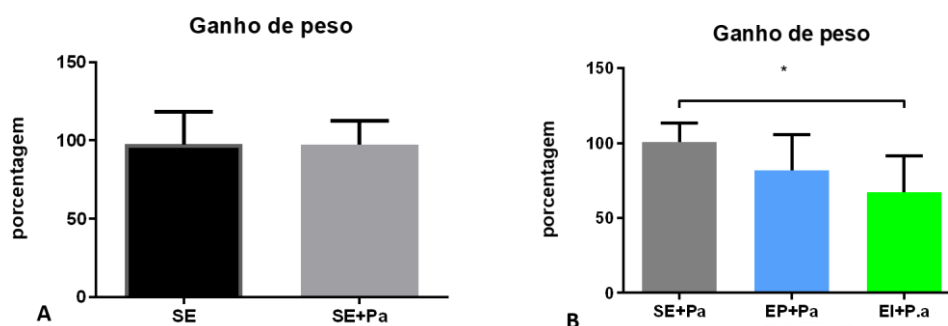
5.1 Parte 1

5.1.1 Análises comportamentais

5.1.1.1 Ganho de peso

Todos os animais sobreviveram durante todo o experimento e aumentaram de peso ao longo do período. Ao comparar o grupo sem intervenção (SE) com o grupo SE+P.a, observou-se ganho de peso médio de $97,41 \pm 19,34$ e $97,14 \pm 14,08$ gramas, respectivamente, sem diferenças entre os grupos (Figura 11 A). Ao comparar os grupos de estresse previsível e imprevisível com o grupo SE+P.a, observou-se ganho de peso menor nos animais que passaram pelo protocolo de estresse imprevisível ($p < 0,05$). Ao comparar os grupos EP+P.a e EI+P.a, a porcentagem de ganho de peso médio foi de $81,94 \pm 21,91$ e $67,37 \pm 21,92$, respectivamente, mas sem diferença entre os grupos (Figura 11 B).

Figura 11 – Gráfico de ganho de peso dos animais ao longo do experimento



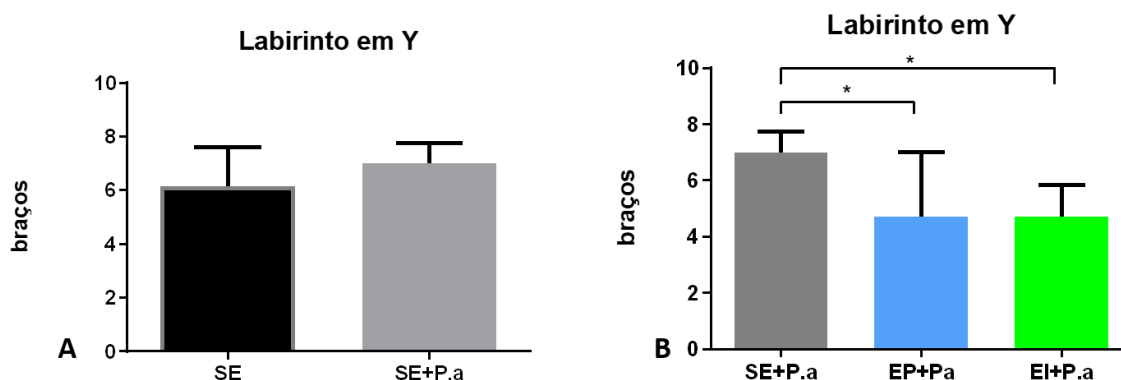
Legenda: a) Comparação do grupo sem estresse sem p.a (SE) e do grupo sem estresse com P.a (SE+P.a); b) Comparação dos grupos sem estresse e P.a (SE+P.a), estresse previsível e P.a (EP+P.a) e estresse imprevisível e P.a (EI+P.a).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.1.2 Labirinto em Y

No quadragésimo segundo dia do experimento, verificou-se que os animais dos grupos SE e SE+P.a apresentaram média de entrada nos braços do dispositivo em Y de $6,14 \pm 1,35$ e $7 \pm 0,70$, respectivamente, sem diferença estatística entre os grupos (Figura 12 A). Quanto aos animais submetidos ao estresse previsível e imprevisível, com periodontite apical, verificou-se a média de entrada nos braços do Y de $4,71 \pm 2,11$ e $4,71 \pm 1,03$, respectivamente, sem diferenças entre os grupos ($p < 0,05$). Ao comparar esses grupos com o grupo SE+P.a verificou-se que os dois tipos de estresse diferiram estatisticamente do grupo SE+P.a ($P < 0,05$) (Figura 12 B).

Figura 12 – Gráfico representativo da quantidade de entrada nos braços do labirinto em Y



Legenda: a) Comparação do grupo sem estresse sem p.a (SE) e do grupo sem estresse com P.a (SE+P.a); b) Comparação dos grupos sem estresse e P.a (SE+P.a), estresse previsível e P.a (EP+P.a) e estresse imprevisível e P.a (EI+P.a).

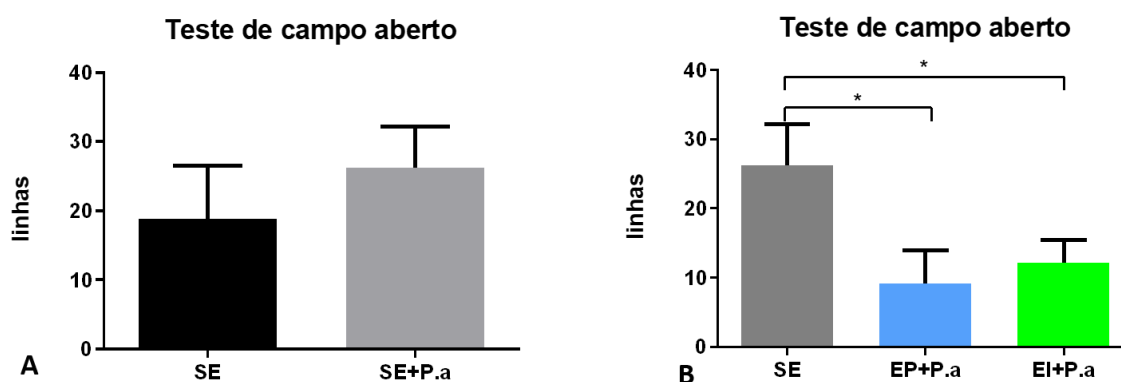
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.1.3 Teste de campo aberto

Ao final do experimento, observou-se que não houve diferença estatística entre o número de linhas cruzadas quando comparados os grupos SE e SE+P.a com média

de linhas cruzadas de $18,85 \pm 7,11$ e $26,25 \pm 5,53$, respectivamente (Figura 13 A). Verificou-se que os grupos de estresse previsível (EP+P.a), e estresse imprevisível (EI+P.a) apresentaram média de linhas cruzadas de $9,14 \pm 4,45$ e $12,14 \pm 3,09$, para os grupos SE+P.a e SI+P.a respectivamente, sem diferença estatística entre eles ($p>0,05$). No entanto, ambos (EP+P.a e EI+P.a) diferiram do grupo sem estresse +P.a ($p<0,05$) (Figura 13 B).

Figura 13 – Gráfico representativo da quantidade de linhas ultrapassada com as quatro patas dos animais no dispositivo de campo aberto



Legenda: a) Comparação do grupo sem estresse (SE) e sem estresse+P.a (SE+P.a); b) Comparação entre os grupos sem estresse + P.a (SE+P.A), estresse previsível + P.a (EP+P.a) e estresse imprevisível + P.a (EI+P.a).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.2 Microtomografia computadorizada

Observou-se que o volume da lesão periapical em ratos estressados pelo protocolo de estresse imprevisível foi maior quando comparado ao dos animais submetidos ao protocolo de estresse previsível ou ainda dos animais não estressados (Tabela 1). Ao comparar o grupo sem estresse+P.a (SE+P.a) com os grupos estresse previsível e estresse imprevisível, ambos com P.a, verificou-se que o grupo estresse

imprevisível (EI+P.a) apresentou lesão periapical significativamente maior do que o grupo sem estresse (SE+P.a) (Figura 14).

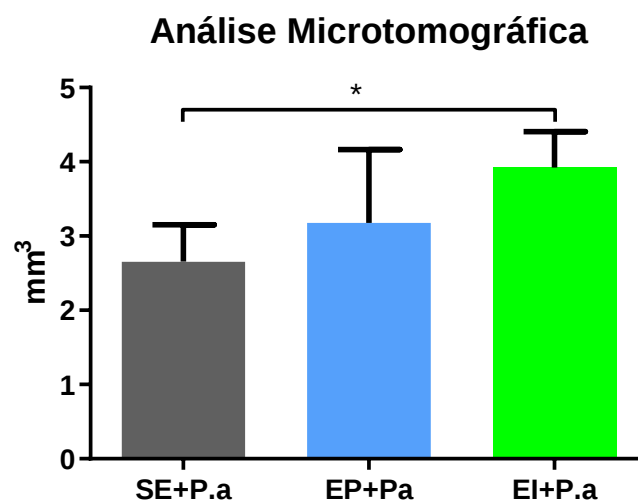
Tabela 1 - Média e Desvio Padrão (DP) do volume da lesão periapical (mm³) dos grupos com P.a

Grupos	Volume da lesão (mm ³) ± DP
SE+P.a	2.65 ± 0.45 ^a
EP+P.a	3.17 ± 0.91 ^{ab}
EI+P.a	3.92 ± 0.44 ^b

* Letras diferentes nas linhas indicam diferenças estatísticas, P <0.05

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14 – Gráfico do volume da lesão periapical nos grupos com P.a

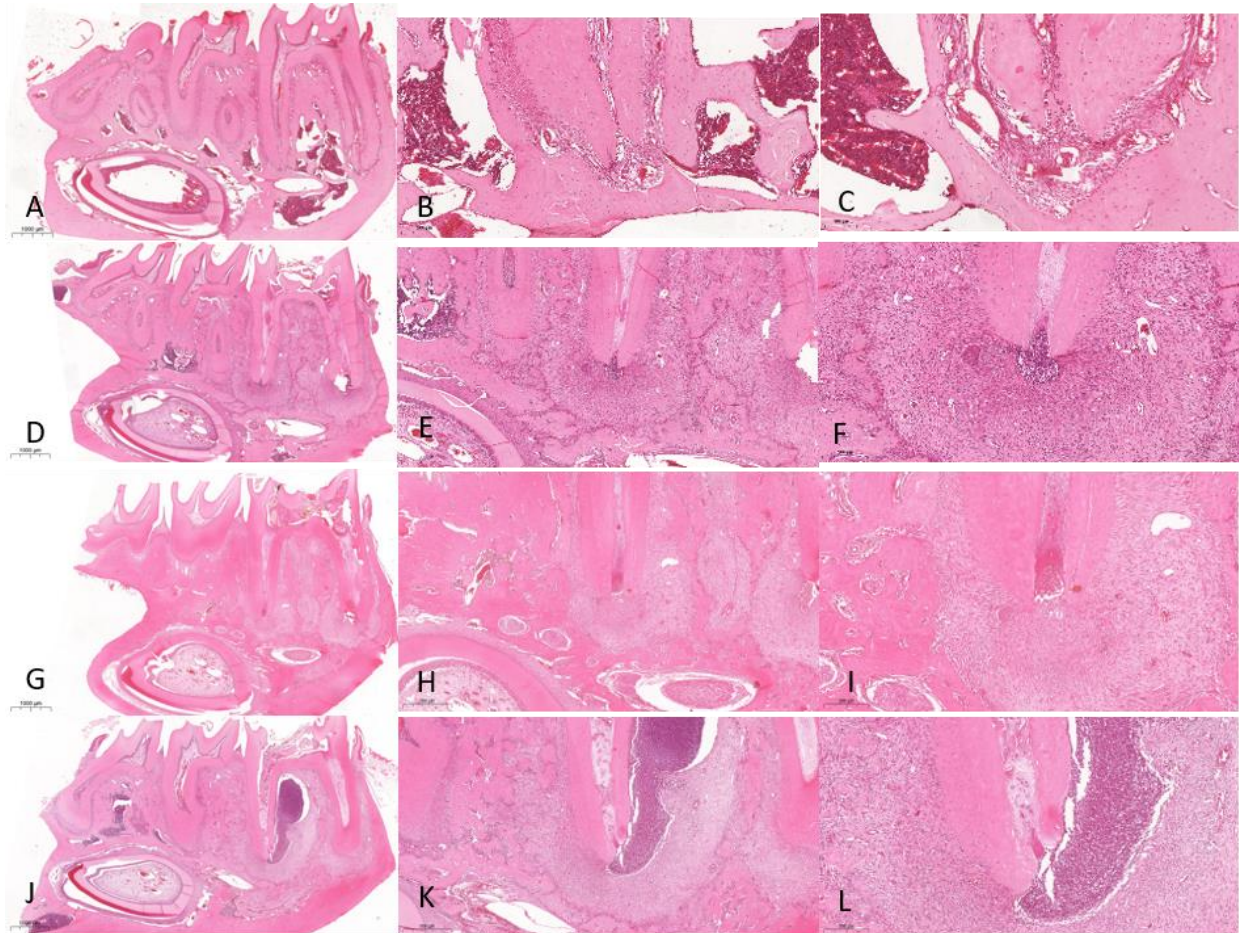


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.3 Análise histológica e histomorfométrica

Evidências do processo inflamatório foram observadas em todos os grupos com exceção do grupo SE sem P.a No grupo estresse imprevisível o processo inflamatório foi mais intenso com diferença estatística entre ele e os demais grupos (Tabela 2). As lesões periapicais apresentaram característica de granuloma periapical e histomorfometricamente, observou-se extensão da lesão periapical semelhante entre os grupos. No entanto, a área da lesão periapical foi maior no grupo imprevisível (Figura 15) (Tabela 2).

Figura 15 – Imagens histológicas representativas das lesões periapicais: cortes histológicos corados por hematoxilina/ eosina



Legenda: As imagens A, D, G e J representam as imagens histológicas com 1x de aumento dos grupos SE, SE+ P.a, EP+P.a e EI+P.a respectivamente; As imagens B, E, H e K representam as imagens com 3x de aumento dos grupos SE, SE+ P.a, EP+P.a e EI+P.a respectivamente; As imagens C, F, I e L representam as imagens histológicas com 7x de aumento dos grupos SE, SE+ P.a, EP+P.a e EI+P.a respectivamente. Observa-se que a extensão das lesões periapicais são maiores e o infiltrado inflamatório mais extenso nos grupos com estresse, especialmente no estresse imprevisível. Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2 – Scores, Mediana, Média, e Desvio Padrão (DP) dos achados histológicos, referente a lesão periapical de todos os grupos

Parâmetros Histológicos	Scores	Grupos			
		SE	SE +P.a	EP+P.a	EI+P.a
Infiltrado Inflamatório	1	8/8	2/8	3/8	1/8
	2	0/8	5/8	4/8	2/8
	3	0/8	1/8	1/8	3/8
	4	0/8	0/8	0/8	2/8
	Mediana	1 ^a	2 ^b	2 ^b	3 ^c
Extensão do infiltrado inflamatório	1	8/8	3/8	3/8	2/8
	2	0/8	5/8	4/8	5/8
	3	0/8	0/8	1/8	1/8
	4	0/8	0/8	0/8	0/8
	Mediana	1 ^a	2 ^b	2 ^b	2 ^b
Área de Lesão Periapical (mm ²)	Média ± DP	0.13 ± 0.016 ^a	0.38 ± 0.065 ^b	0.32 ± 0.099 ^{bc}	0.53 ± 0.12 ^c

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

Fonte: Elaborado pelo autor.

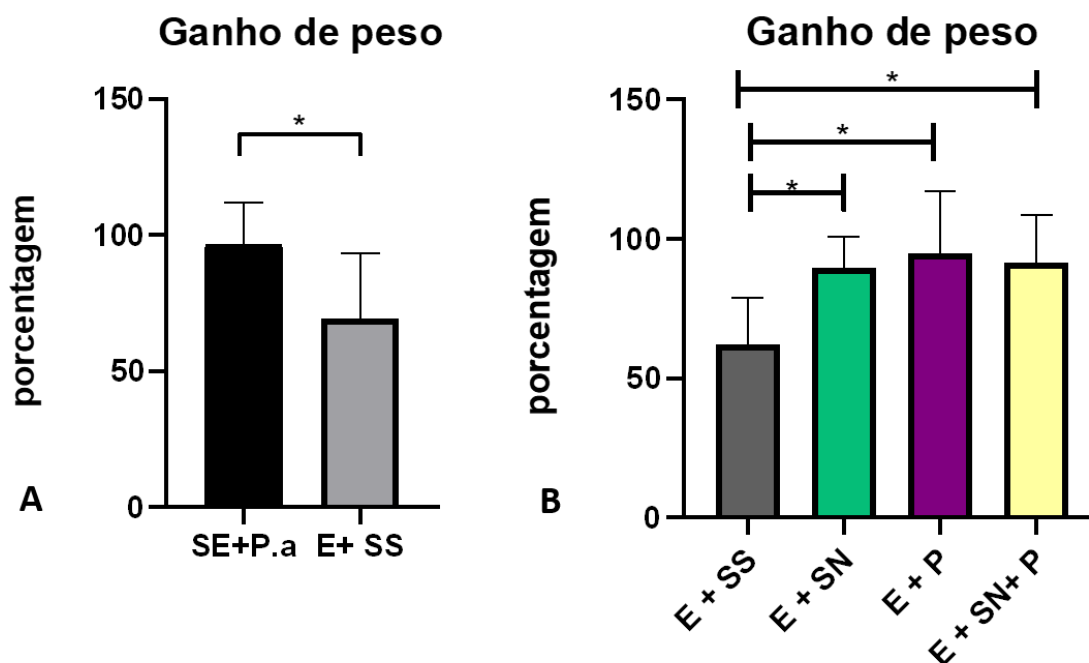
5.2 Parte 2

5.2.1 Análises comportamentais

5.2.1.1 Ganho de peso

Todos os animais sobreviveram durante toda a segunda etapa do experimento. Observou-se que todos os animais aumentaram de peso ao longo do período. Comparando o grupo SE+P.a e E+SS, observa-se que houve diferença no ganho de peso entre eles (Figura 16 A), sendo o grupo estressado o que menos ganhou peso ao longo do experimento com média de 96.71 ± 14.18 e 69.28 ± 22.35 gramas, respectivamente. Ao comparar os grupos estressados, observa-se que o ganho de peso foi significativamente menor no grupo E + SS. Os animais dos grupos com administração de sinvastatina, propranolol e a associação das medicações apresentaram maior porcentagem de ganho de peso com médias de 89.60 ± 9.91 , 92.83 ± 22.06 e 91.5 ± 16.02 gramas, respectivamente. No entanto, não houve diferença no ganho de peso dos animais dos grupos medicados com Sinvastatina, Propranolol e associação de ambos (Figura 16 B).

Figura 16 - Gráfico do ganho de peso médio dos animais dos diferentes grupos



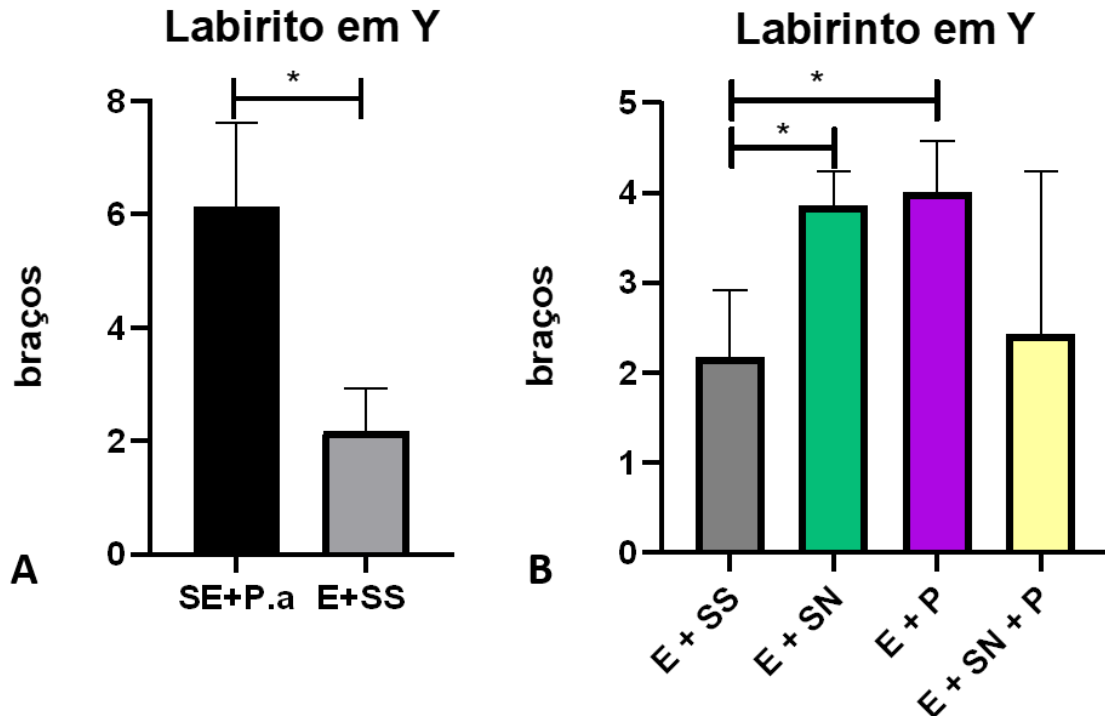
Legenda: A) Comparação do grupo SE (Sem estresse) e E +SS (Estresse+Solução Salina); B) Comparação dos grupos E+SS (Estresse+ Solução Salina), E+SN (Estresse+Sinvastatina), E+P (Estresse+Propranolol) e E + SN + P (Estresse + Sinvastatina+Propranolol).

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.1.2 Labirinto em Y

A quantidade média de entrada em braço do dispositivo em Y nos animais dos grupos SE+P.a e E+ SS foi de 6.14 ± 1.35 e 2.16 ± 0.68 , respectivamente, com diferença estatística entre eles. Nos animais medicados, observou-se que nos grupos sinvastatina e propranolol a entrada média nos braços do Y foi de 3.85 ± 0.34 e 4 ± 0.53 . Esses grupos foram estatisticamente diferentes do grupo E+SS. O grupo E +SN + P não diferiu estatisticamente do grupo E +SS e teve média de 2.42 ± 1.68 entrada em braços ($p < 0,05$) (Figura 17).

Figura 17 – Gráfico da quantidade média de entrada nos braços do dispositivo em Y



Legenda: a) Comparação entre os grupos sem estresse e estressado com administração de solução salina; b) Comparação entre os grupos estressados e administração das diferentes medicações .

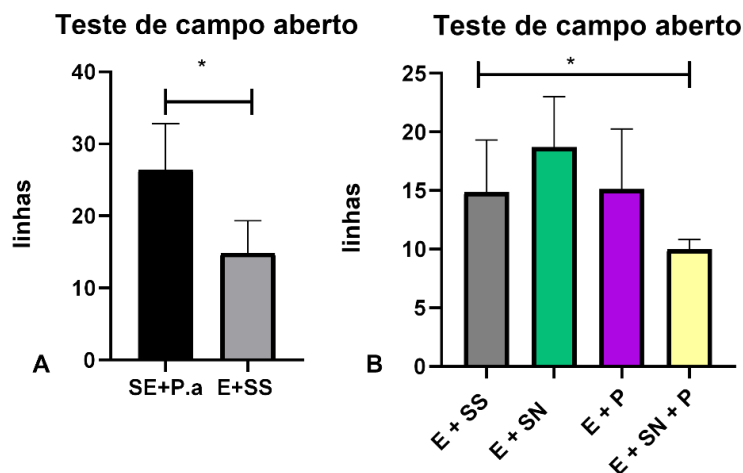
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.1.3 Teste de campo aberto

Ao final do experimento, observou-se diferenças entre os grupos SE+P.a e E+SS no número de linhas cruzadas pelos animais com média de 26.42 ± 5.9 e 14.85 ± 4.1 linhas cruzadas, respectivamente. Em relação aos grupos medicados, observou-se que os grupos sinvastatina e propranolol tiveram quantidades de linhas cruzadas de 18.71 ± 3.95 e 15.14 ± 4.73 , respectivamente, esses números foram ligeiramente superiores aos animais onde foi administrada a solução salina, mas sem diferença estatística. O grupo da associação da sinvastatina e propranolol apresentou menor

número de linhas cruzadas com média de 10 ± 0.63 e foi diferente do grupo E+SS ($p < 0.05$) (Figura 18).

Figura 18 – Gráfico da quantidade média de linhas ultrapassadas com as quatro patas no dispositivo de campo aberto



Legenda: a) Comparação entre os grupos sem estresse e estressado com administração de solução salina; b) Comparação entre os grupos estressados e administração das diferentes medicações .

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.2 Análise microtomográfica

O volume da lesão periapical nos animais estressados + SS foi significativamente maior do que nos animais não estressados (SE+P.a) (Figura 19 A). Ao comparar os animais medicados com o grupo estressado+SS, verificou-se que o volume da lesão foi menor em todos os grupos medicados, com diferença estatística entre os grupos E+SS e E+SN e entre os grupos E+SS e E+P (Figura 19 B) (Tabela 3).

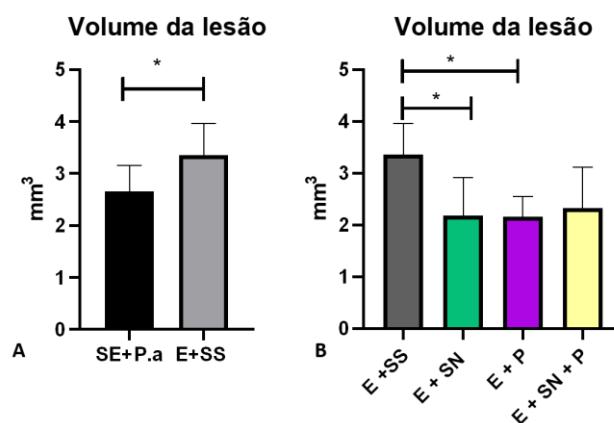
Tabela 3 - Média e Desvio Padrão (DP) do volume tecidual da lesão (mm³) dos grupos de estudo

Grupos	Volume da lesão (mm ³) ± DP
SE+P.a	2.65 ± 0.45 ^a
E+SS	3.35 ± 0.55 ^b
E+SN	2.18 ± 0.67 ^a
E+ P	2.15 ± 0.35 ^a
E + SN+ P	2.32 ± 0.71 ^{ab}

* Letras diferentes nas linhas indicam diferenças estatísticas, P <0.05

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 19 – Gráfico do volume médio das lesões periapicais nos diferentes grupos



Legenda: a) Comparação do grupo sem estresse e P.a e estressado+P.a com administração de solução salina; b) Comparação dos grupos sem estressados com as diferentes medicações .

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.3 Análise histológica e histomorfométrica

As evidências do processo inflamatório na região periapical foram observadas em todos os grupos. O grupo E+SS apresentou área de lesão periapical maior do que os demais grupos e foi estatisticamente diferente dos grupos SE +P.a, E+SN e E+P. Os grupos Propranolol e Sinvastatina, não foram diferentes estatisticamente, sendo que ambos reduziram a perda óssea periapical. Quanto a intensidade e extensão do infiltrado inflamatório verificou-se o estresse sem uso de medicações (grupo E+SS) apresentou valores de escores estatisticamente maiores que os demais grupos. As medicação, Propranolol, Sinvastatina e suas associações diminuíram a intensidade e a extensão do processo inflamatório de ratos submetidos ao estresse sendo semelhante aos valores obtidos no grupo sem estresse. A figura 20 ilustra as lesões periapicais dos diferentes grupos.

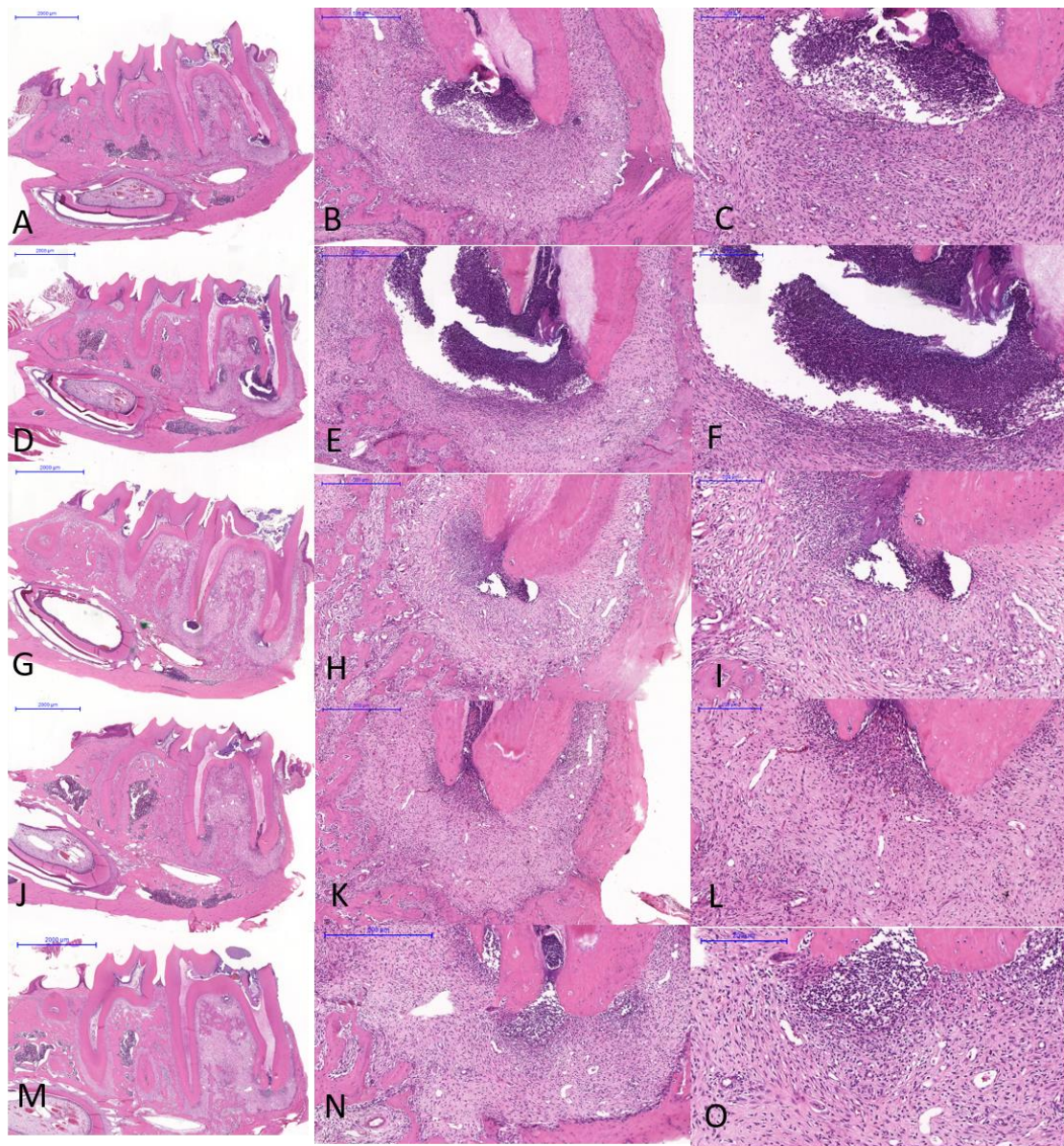
Tabela 4 – Scores, Mediana, Média, e Desvio Padrão (DP) dos achados histológicos, referente a lesão periapical de todos os grupos

Parâmetros Histológicos	Scores	Grupos				
		SE+P.a	E+SS	E+SN	E+P	E+SN+P
Infiltrado Inflamatório	1	2/8	1/8	3/8	4/8	3/8
	2	5/8	2/8	4/8	3/8	3/8
	3	1/8	5/8	1/8	1/8	2/8
	4	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8
	Mediana	2 ^a	3 ^b	2 ^a	2 ^a	2 ^a
Extensão do infiltrado inflamatório	1	3/8	1/8	2/8	1/8	3/8
	2	5/8	2/8	4/8	4/8	4/8
	3	0/8	5/8	2/8	1/8	1/8
	4	0/8	0/8	0/8	1/8	0/8
	Mediana	2 ^a	3 ^b	2 ^a	2 ^a	2 ^a
Área de Lesão Periapical (mm ²)	Média ± DP	0.38 ± 0.065 ^a	0.47 ± 0.05 ^b	0.27 ± 0.04 ^a	0.25 ± 0.02 ^a	0.40 ± 0.1 ^b

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

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 – Imagens histológicas das lesões periapicais: cortes histológicos corados por hematoxilina/ eosina



Legenda: As imagens A, D, G, J e M representam as imagens histológicas com 1x de aumento dos grupos SE+ P.a, E+SS, E+SN, E+P e E+SN+P respectivamente; As imagens B, E, H, K e N representam as imagens com 3x de aumento dos grupos SE+ P.a, E+SS, E+SN, E+P e E+SN+P respectivamente; As imagens C, F, I, L e O representam as imagens histológicas com 7x de aumento dos grupos SE+ P.a, E+SS, E+SN, E+P e E+SN+P respectivamente. Observa-se que a extensão das lesões periapicais são maiores e o infiltrado inflamatório mais extenso no grupos estresse com administração de solução salina.

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). A influência do estresse na resposta imune do hospedeiro é bem estabelecida na literatura (Dragoș, Tănăsescu, 2010). 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., 1996; Gaspersic et al., 2002; Katori et al., 2012).

Na área da odontologia o estresse também vem sendo estudado, principalmente na área da periodontia. Diversos estudos tem correlacionado os efeitos do estresse na progressão da perda óssea periodontal (Genco et al., 1999; Huaixiu Lu et al., 2014; Rosania et al., 2009). Entretanto, na endodontia encontramos apenas 3 estudos que fazem a mesma correlação (Gomes et al., 2019; Khoury et al., 2020; Minhoto et al., 2021). Sabe-se que há uma semelhança na origem e composição dos microorganismos presentes tanto na doença periodontal como na periodontite apical (Siqueira, Rôças, 2007) e acredita-se que as mesmas doenças sistêmicas associadas a periodontite podem estar associadas à lesão periapical (Segura-Egea et al., 2015).

Na área da endodontia, Gomes et al. (2019), relacionam a influência do estresse com a progressão da lesão periapical, por meio de análise radiográfica e histológica, através da utilização de um modelo de estresse crônico previsível onde utilizou-se uma caixa de condicionamento ao medo em que diariamente os animais eram expostos a estímulos estressores de choque nas patas. Khoury et al. (2020) utilizaram um modelo de estresse crônico imprevisível, onde diferentes estímulos estressores eram aplicados diariamente, de modo a impedir a adaptação do animal. Além disso em ambos os estudos a indução do estresse crônico ocorreu concomitante a indução da lesão periapical. Minhoto et al. (2021) realizaram um estudo afim de avaliar a progressão da periodontite apical em um organismo que já estivesse em uma condição de estresse crônico visto que o quadro de estresse crônico necessita de um período de 2 a 5 semanas para se estabelecer (Campos et al., 2013). A partir deste estudo observou-se que o melhor período para avaliação do efeito do estresse na

periodontite apical era de 21 dias e que a indução da lesão deve ser realizada em organismo já estressado. Entretanto, os modelos de indução de estresse nos estudos foram diferentes, sendo de estresse previsível no de Gomes et al. (2019) e imprevisível nos estudos de Khoury et al. (2020) e Minhoto et al. (2021). Assim, metodologias diferentes de estresse podem trazer alterações nas respostas do hospedeiro visto a complexidade deste fenômeno.

A literatura sobre indução de estresse em modelos animais mostra 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, File, 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 é 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, 1997). Tal metodologia é amplamente validada e utilizada visto que a aleatoriedade dos estímulos evita a adaptação dos animais ao estresse (Campos et al., 2013).

Portanto, uma vez que estudos envolvendo estresse são extremamente sensíveis e questionados, neste estudo preconizou-se avaliar duas diferentes metodologias de indução de estresse crônico em animais, afim de padronizar a forma de avaliação do estresse no sistema nervoso central do animal e observar se há diferenças nos resultados quando se utiliza metodologias diferentes.

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). Além disso, preconizou-se que as cavidades pulpares ficassem expostas pelo período de 21 como já observado por Minhoto et al. (2021) em que o volume e área da lesão eram

significativamente maiores nos animais estressados do que nos não estressados no mesmo período de análise.

O método escolhido para confirmação do estresse crônico nos animais foi o peso e as análises comportamentais de labirinto em y e campo aberto. A diferença no ganho de peso dos animais é um critério significativo para avaliar se o estresse foi eficaz. No estudo realizado por (Marin et al., 2007) observou-se que o ganho de peso em animais estressados foi menor que nos não estressados. No presente estudo, observou-se que os animais estressados pelo protocolo de estresse imprevisível, apresentaram menor ganho de peso do que animais não estressados. Já o grupo estressado pelo protocolo previsível, embora tenha sido observado menor ganho de peso comparado aos animais não estressados e maior quando comparado ao grupo estresse imprevisível não houve diferença estatística em ambas as comparações. Os estudos de Khoury et al. (2020) e Minhoto et al. (2021) utilizaram o protocolo de estresse previsível e obtiveram resultados que concordam com os resultados obtidos neste estudo, mostrando que o estresse imprevisível gera menor ganho de peso em animais.

O teste de campo aberto é utilizado em estudos da neurobiologia da ansiedade e na triagem de novos alvos de drogas e compostos ansiolíticos. Este teste usa uma câmera para medir o movimento do animal em uma caixa de acrílico para avaliação da locomoção e comportamento do tipo ansiedade e depressão em ratos (AK et al., 2019). Neste estudo, observou-se que ambos os protocolos de estresse, previsível e imprevisível, ocasionaram em redução da atividade locomotora do animal quando comparado ao grupo sem estresse, o que também foi observado no estudo de Gomes et al., onde foi utilizado o estresse crônico previsível e os animais estressados apresentaram queda da atividade locomotora (Gomes et al., 2019). No estudo de Hu et al. (2017), utilizou-se o modelo de estresse crônico imprevisível em um período de 6 semanas para avaliar a confiabilidade deste protocolo de estresse, foi utilizado o teste de campo aberto e os autores verificaram redução significativa da atividade locomotora dos animais estressados, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo (Hu et al., 2017).

Para avaliação comportamental dos efeitos do estresse nos animais, também foi utilizado um dispositivo de acrílico em formato de Y com três braços com as seguintes medidas: 45 X 35 X 12cm. Os animais foram colocados um por vez na área

de intersecção dos três braços, permitindo que os mesmos tomassem decisões sobre o trajeto percorrido. Este teste foi utilizado para analisar se a capacidade exploratória do animal estava alterada. A partir dos resultados, observou-se que houve redução na capacidade exploratória dos animais em ambos os grupos estressados.

Ao avaliar o efeito do estresse na lesão periapical Verificou-se histologicamente a presença de um infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear caracterizam 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, observou-se que a intensidade do infiltrado inflamatório foi significativamente maior no grupo do protocolo de estresse crônico imprevisível e com diferença estatística quando comparado do grupo do estresse crônico previsível. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Minhoto et al. (2021), onde observou-se que os animais submetidos ao estresse imprevisível apresentavam maior intensidade de infiltrado inflamatório. Porém estes resultados diferem do encontrado por Gomes et al. (2019) onde foi observado que o infiltrado inflamatório era mais intenso nos animais estressados utilizando o protocolo de estresse crônico previsível. Em relação a extensão e a área da lesão, observou-se maior área de lesão periapical nos animais submetidos ao estresse imprevisível quando comparado ao grupo não estressado. No entanto, o grupo estresse previsível apresentou área de lesão periapical semelhante ao grupo sem estresse, não diferendo estatisticamente de nenhum dos grupos. Tal achado corrobora com os resultados de Minhoto et al. (2021) e difere do resultado de Gomes et al. (2019) que observou área de lesão significativamente maior nos animais estressados pelo protocolo de estresse previsível (Gomes et al., 2019; Minhoto et al., 2021).

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. A partir dela resultados semelhantes aos encontrado na análise histológica foi observado, com maior volume de lesão periapical nos animais do grupo estresse imprevisível. O mesmo foi encontrado no estudo de Minhoto et al. (2021) e

não verificou-se na área da endodontia estudos avaliando, que avaliasse o volume da lesão periapical em ratos estressados pelo protocolo de estresse previsível. O estudo de Gomes et al. (2019) apresenta limitações, especialmente na análise da lesão periapical. Sendo assim, o presente estudo traz contribuições importantes na área.

A partir dos resultados obtidos na primeira etapa do trabalho, conclui-se que o estresse crônico imprevisível apresenta resultados mais significativos na condição de estresse generalizada. Portanto, na segunda etapa do trabalho objetivamos avaliar o efeito de duas medicações sistêmicas, Sinvastatina e Propranolol sobre lesões periapicais de animais estressados cronicamente, por meio do estresse imprevisível.

A sinvastatina é uma medicação comumente utilizada para redução de lipídeos em pacientes com hipercolesterolemia. O colesterol é uma molécula importante da membrana celular e participa de funções neurológicas, regulando o estado de humor e resposta antidepressiva (De Berardis et al., 2009; Papakostas et al., 2003). Além disso, hipercolesterolemia aumenta significativamente o risco de aterosclerose, o risco de doenças coronárias, acidente vascular cerebral e até mesmo depressão (Vance, 2012). A utilização de estatinas no bem estar psicológico vem sendo amplamente estudada, apesar de alguns resultados contraditórios na literatura (Agostini et al., 2007; Hoogwegt et al., 2013), porém a longo prazo o uso de estatinas parece estar associado a menor risco de ansiedade e depressão (Young-Xu et al., 2003). Em uma meta- análise de 2014 de sete estudos observacionais. Parsaik et al. 2014 observaram que o uso de estatinas está associado a um menor risco de depressão levando os olhares para as estatinas como futuros antidepressivos (Parsaik et al., 2014).

O propranolol é uma medicação beta bloqueadora adrenérgica muito utilizada por pacientes cardiopatas. Os receptores adrenérgicos pertencem a uma classe de receptores acoplados a proteínas que são alvos das catecolaminas, que são substâncias altamente liberadas em condições estressantes. Muitas células possuem esses receptores, e a ligação de uma catecolamina ao seu receptor geralmente estimula o sistema nervoso simpático. Esta ligação por sua vez está relacionada com o sistema imune do indivíduo. Há apenas um estudo que avalia o efeito de um betabloqueador no desenvolvimento da lesão periapical de animais estressados, e os resultados apesar de serem favoráveis, não esclarecem o papel do betabloqueador nesse processo.

Nos testes comportamentais observou-se que o ganho de peso dos animais de todos os grupos medicados foi superior ao grupo estressado, além disto, os animais estressados tiveram menor ganho de peso quando comparado ao grupo sem estresse o que está de acordo com estudos prévios de Minhoto et al. (2021) e Khoury et al. (2019), onde já havia sido mostrada esta relação.

Na análise de campo aberto, observou-se que a administração de Sinvastatina permitiu que os animais tivessem maior atividade locomotora durante o teste de campo aberto porém sem diferença estatística, visto que o desvio padrão foi significativo e testes comportamentais são facilmente influenciados por questões ambientais. Quando comparada o número de linhas cruzadas, no trabalho de Naserzadeh et al. (2019), a administração de Sinvastatina também não mostrou efetividade no aumento do número de linhas cruzadas, porém observou-se uma diminuição do tempo de latência, o que também deve ser levado em consideração na condição de estresse do animal. Os animais medicados com propranolol apresentaram maior atividade locomotora que os animais estressados, porém similar ao que houve no grupo medicado com Sinvastatina, devido ao desvio padrão não houve diferença estatística. Em estudos que avaliam a redução de comportamento ansioso no animal, causado por abstinência a drogas, o propranolol teve a capacidade de reduzir a atividade locomotora, caracterizando por diminuição da ansiedade, o que pode justificar estes resultados (Citó et al., 2012).

No teste de labirinto em Y houve diferença estatística do grupo da administração da Sinvastatina com o grupo estressado, o que corrobora com o estudo de Fahim et al. (2019). Houve diferença também no grupo com administração de propranolol comparado ao grupo da solução salina, já o grupo da associação não apresentou diferenças significativas com o grupo da solução salina.

Na análise microtomográfica, verificou-se que o volume da lesão periapical reduziu significativamente nos animais estressados após a administração de Sinvastatina. A diminuição do volume de lesões periodontais pelo uso da Sinvastatina também foi observado no estudo de (Jin et al., 2014). No entanto, neste estudo não foi induzido estresse nos animais, sugerindo portanto que além do efeito no estresse, a Sinvastatina pode inibir a osteoclastogênese em ratos normais. A Sinvastatina apresenta um efeito positivo na neuroinflamação e também no metabolismo ósseo, sugerindo que esta substância tem potencial para ser empregada em terapias para

depressão. Também verificou-se diminuição do volume da lesão periapical no grupo de estresse com administração de propranolol. Na área da endodontia alguns estudos já correlacionaram a diminuição da progressão da lesão periapical em ratos, devido a ação da Sinvastatina na apoptose de células osteoblásticas (EH et al., 2012; Yang et al., 2019). Porém, este é o primeiro estudo avaliando o efeito da Sinvastatina no comportamento depressivo de animais submetidos ao estresse crônico na área da endodontia. Em relação ao menor volume das lesões periapicais no grupo com administração de propranolol, resultados similares foram observados por Khoury et al. 2019, onde o menor número de células osteoclásticas foi observado no grupo da administração da medicação, mesmo sem que fosse observada diferença no volume da lesão periapical. Khoury et al. (2019) demonstrou que apesar de não ser tão esclarecido, seus resultados sugerem que há influência do sistema nervoso simpático na liberação de citocinas inflamatórias, reduzindo a liberação destas e por consequência reduzindo a perda óssea periapical, o que também foi observado no presente estudo. Apesar do volume da lesão ter sido menor no grupo da associação, o desvio padrão foi grande impedindo que essa diferença fosse significativa. Não há estudos que avaliem a associação de ambas as medicações no efeito sobre o estresse crônico, bem como no efeito da perda óssea periapical.

Na análise histológica foi observado que a área da lesão periapical foi menor nos animais medicados com Sinvastatina e nos animais medicados com Propranolol, resultados que estão de acordo com os resultados de perda óssea obtidos na análise microtomográfica. Observou-se que não houve diferença no grupo em que a associação foi administrada. Acredita-se que a administração de duas medicações pode ter sido um fator de estresse adicional aos animais e até mesmo de efeitos antagonistas.

Verificou-se portanto que o estresse, especialmente o imprevisível influencia o comportamento dos animais e o desenvolvimento das lesões periapicais e medicações como o Propranolol e a Sinvastatina podem minimizar esses efeitos do estresse.

7 CONCLUSÃO

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

- 1) O estresse crônico imprevisível induz efeitos comportamentais de estresse crônico mais significativo que o estresse previsível;
- 2) O estresse crônico imprevisível aumenta a perda óssea periapical em animais com periodontite apical induzida
- 3) A Administração de Sinvastatina reduz comportamentos compatíveis com estresse crônico em animais submetidos ao estresse crônico imprevisível, bem como reduz a perda óssea periapical em ratos com periodontite apical induzida;
- 4) A Administração de Propranolol reduz comportamentos compatíveis com estresse crônico em animais submetidos ao estresse crônico imprevisível, bem como reduz a perda óssea periapical em ratos com periodontite apical induzida.
- 5) A administração de ambas as medicações, Propranolol e Sinvastatina, não mostrou alterações na perda óssea periapical em ratos com periodontite apical induzida.

REFERÊNCIAS*

Abeles AM, Pillinger MH. Statins as antiinflammatory and immunomodulatory agents: A future in rheumatologic therapy? *Arthritis Rheum.* 2006;54(2):393–407. doi: 10.1002/art.21521.

Adell A, Trullas R, Gelpi E. Time course of changes in serotonin and noradrenaline in rat brain after predictable or unpredictable shock. *Brain Res.* 1988;459(1):54–9. doi: 10.1016/0006-8993(88)90285-5.

Agostini J V, Tinetti ME, Han L, McAvay G, Foody JAM, Concato J. Effects of statin use on muscle strength, cognition, and depressive symptoms in older adults. *J Am Geriatr Soc.* 2007;55(3):420–5. doi: 10.1111/J.1532-5415.2007.01071.X.

AK K, PC G, Z S. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. *Methods Mol Biol.* 2019;1916:99–103. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_9.

Ayed MS, Shafiq SS, Diab HM, Alahmari AD, Divakar DD. Assessing periapical dental radiographs as a screening parameter for early indications of osteoporosis in postmenopausal periodontal patients and root surface evaluation using spectrochemical analysis. *Saudi Med J.* 2018;39(7):719–24. doi: 10.15537/smj.2018.7.22453.

Balduini W, Mazzoni E, Carloni S, De Simoni MG, Perego C, Sironi L, et al. Prophylactic but not delayed administration of simvastatin protects against long-lasting cognitive and morphological consequences of neonatal hypoxic-ischemic brain injury, reduces interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α mRNA induction, and does not affect endothelial nitric oxide synthase expression. *Stroke.* 2003;34(8):2007–12. doi: 10.1161/01.STR.0000080677.24419.88.

De Berardis D, Conti CMV, Serroni N, Moschetta FS, Carano A, Salerno RM, et al. The role of cholesterol levels in mood disorders and suicide. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2009;23(3):133–40.

Blandino P, Barnum CJ, Deak T. The involvement of norepinephrine and microglia in hypothalamic and splenic IL-1 β responses to stress. *J Neuroimmunol.* 2006;173(1–2):87–95. doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.11.021.

Breivik T, Thrane PS, Murison R, Gjermo P. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(4):327–34. doi: 10.1111/j.1600-0722.1996.tb00087.x.

Brod SA, Benjamin D, Hafler DA. Restricted T cell expression of IL-2/IFN- γ mRNA in human inflammatory disease. *J Immunol.* 1991;147(3).

Campos AC, Fogaça M v., Aguiar DC, Guimarães FS. Animal models of anxiety disorders and stress. *Braz J Psychiatry*. 2013;35(SUPPL.2). doi: 10.1590/1516-4446-2013-1139.

Castro MML, Nascimento PC, Souza-Monteiro D, Santos SM, Arouck MB, Garcia VB, et al. Blood oxidative stress modulates alveolar bone loss in chronically stressed rats. *Int J Mol Sci*. 2020;21(10). doi: 10.3390/ijms21103728.

Chauhan N, Mittal S, Tewari S, Sen J, Laller K. Association of Apical Periodontitis with Cardiovascular Disease via Noninvasive Assessment of Endothelial Function and Subclinical Atherosclerosis. *J Endod*. 2019;45(6):681–90. doi: 10.1016/j.joen.2019.03.003.

Chen SF, Hung TH, Chen CC, Lin KH, Huang YN, Tsai HC, et al. Lovastatin improves histological and functional outcomes and reduces inflammation after experimental traumatic brain injury. *Life Sci*. 2007;81(4):288–98. doi: 10.1016/j.lfs.2007.05.023.

Cintra LTA, Samuel RO, Facundo ACS, Prieto AKC, Sumida DH, Bomfim SRM, et al. Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. *Int Endod J*. 2014;47(3):228–37. doi: 10.1111/iej.12136.

Citó M do C de O, da Silva FCC, Silva MIG, Moura BA, Macêdo DS, Woods DJ, et al. Reversal of cocaine withdrawal-induced anxiety by ondansetron, buspirone and propranolol. *Behav Brain Res*. 2012;231(1):116–23. doi: 10.1016/j.bbr.2012.01.056.

Dragoş D, Tănăsescu MD. The effect of stress on the defense systems. *J Med Life*. 2010;3(1):10–8.

Dumitrescu AL. Depression and inflammatory periodontal disease considerations-an interdisciplinary approach. *Front Psychol*. 2016;7(MAR). doi: 10.3389/fpsyg.2016.00347.

EH L, CY H, SH K, KL H, LH C, LD L, et al. Simvastatin alleviates the progression of periapical lesions by modulating autophagy and apoptosis in osteoblasts. *J Endod*. 2012;38(6):757–63. doi: 10.1016/J.JOEN.2012.02.023.

ElBatsh MM. Antidepressant-like effect of simvastatin in diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2015;93(8):649–56. doi: 10.1139/cjpp-2014-0560.

Fawzy Fahim V, Wadie W, Shafik AN, Ishak Attallah M. Role of simvastatin and insulin in memory protection in a rat model of diabetes mellitus and dementia. *Brain Res Bull*. 2019;144:21–7. doi: 10.1016/J.BRAINRESBULL.2018.10.012.

Francisconi CF, Vieira AE, Biguetti CC, Glowacki AJ, Trombone APF, Letra A, et al. Characterization of the protective role of regulatory T cells in experimental periapical

lesion development and their chemoattraction manipulation as a therapeutic tool. *J Endod.* 2016;42(1):120–6. doi: 10.1016/j.joen.2015.09.022.

Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Skaleric U, Gašperšič R, Štiblar-Martinčič D, Skalerič U. Influence of restraint stress on ligature-induced periodontitis in rats. *Eur J Oral Sci.* 2002;110(2):125–9. doi: 10.1034/j.1600-0722.2002.11153.x.

Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol.* 1999;70(7):711–23. doi: 10.1902/jop.1999.70.7.711.

Gomes ESB, Farias LC, Silveira LH, Jesus CÍ de, Rocha RG da, Ramos GV, et al. Conditioned fear stress increases bone resorption in apical periodontitis lesions in Wistar male rats. *Arch Oral Biol.* 2019;97:35–41. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.10.004.

Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol.* 2011;3(1):5304. doi: 10.3402/jom.v3i0.5304.

Haffner-Luntzer Melanie, Foertsch S, Fischer V, Prystaz K, Tschaffon M, Mödinger Y, et al. Chronic psychosocial stress compromises the immune response and endochondral ossification during bone fracture healing via β -AR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(17):8615–22. doi: 10.1073/pnas.1819218116.

Haffner-Luntzer M, Foertsch S, Fischer V, Prystaz K, Tschaffon M, Mödinger Y, et al. Chronic psychosocial stress compromises the immune response and endochondral ossification during bone fracture healing via β -AR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(17):8615–22. doi: 10.1073/PNAS.1819218116.

Haile CN, GrandPre T, Kosten TA. Chronic unpredictable stress, but not chronic predictable stress, enhances the sensitivity to the behavioral effects of cocaine in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2001;154(2):213–20. doi: 10.1007/S002130000650.

Hoogwegt MT, Theuns DAMJ, Kupper N, Jordaens L, Pedersen SS. Relation of statin therapy to psychological functioning in patients with an implantable cardioverter defibrillator. *Am J Cardiol.* 2013;111(8):1169–74. doi: 10.1016/J.AMJCARD.2012.12.047.

Hu C, Luo Y, Wang H, Kuang S, Liang G, Yang Y, et al. Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *PLoS One.* 2017;12(9):e0185129.

Hua LEH, Yuan HC, Heng KS, Liang HK, Hsiu CL, Deh LL, et al. Simvastatin alleviates the progression of periapical lesions by modulating autophagy and apoptosis in osteoblasts. *J Endod.* 2012;38(6):757–63.

Jakovljevic A, Knezevic A, Karalic D, Soldatovic I, Popovic B, Milasin J, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: Correlation with clinical and histological findings. *Aust Endod J*. 2015;41(2):72–7. doi: 10.1111/aej.12072.

Jin J, Zhang X, Lu Z, Li Y, Lopes-Virella MF, Yu H, et al. Simvastatin inhibits lipopolysaccharide-induced osteoclastogenesis and reduces alveolar bone loss in experimental periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2014;49(4):518–26. doi: 10.1111/jre.12132.

Joëls M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(6):459–66. doi: 10.1038/nrn2632.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol*. 1965;20(3):340–9. doi: 10.1016/0030-4220(65)90166-0.

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(4):414–24. doi: 10.1597/10-121.

Khoury RD, Prado RF do, Matos F de S, Meireles BR de, Cardoso FG da R, Oliveira LD de, et al. The influence of adrenergic blockade in rats with apical periodontitis under chronic stress conditions. *Arch Oral Biol*. 2020;110. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104590.

Kilic F, Ozatik Y, Kaygisiz B, Baydemir C, Erol K. Acute antidepressant and anxiolytic effects of simvastatin and its mechanisms in rats. *Neurosciences (Riyadh)*. 2012;17(1):39–43.

Koprdivá R, Bögi E, Belovičová K, Sedláčková N, Okuliarová M, Ujházy E, et al. Chronic unpredictable mild stress paradigm in male Wistar rats: effect on anxiety- and depressive-like behavior. *Neuro Endocrinol Lett*. 2016;37(Suppl1):103–10.

Kwan LS, Heng KS, Ling LY, Liang HK, Ting LY, Hsiung CM, et al. Simvastatin as a Novel Strategy To Alleviate Periapical Lesions. *J Endod*. 2009;35(5):657–62. doi: 10.1016/j.joen.2009.02.004.

Lei Q, Peng WN, You H, Hu ZP, Lu W. Statins in nervous system-associated diseases: Angels or devils? *Pharmacol Ther*. 2014;69(6):448–54. doi: 10.1691/ph.2014.3892.

Lim SW, Shiue YL, Liao JC, Wee HY, Wang CC, Chio CC, et al. Simvastatin therapy in the acute stage of traumatic brain injury attenuates brain trauma-induced depression-like behavior in rats by reducing neuroinflammation in the hippocampus. *neurocrit care*. 2017;26(1):122–32. doi: 10.1007/s12028-016-0290-6.

Lin P-Y, Chang AYW, Lin T-K. Simvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in rats exposed to chronic mild stress. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014;124:174–9. doi: 10.1016/j.pbb.2014.06.006.

Lin S, Kok S, Lee Y, Hou K, Lin Y, Chen M, et al. Simvastatin as a novel strategy to alleviate periapical lesions. *J Endod.* 2009;35(5):657–62. doi: 10.1016/J.JOEN.2009.02.004.

Lindberg C, Crisby M, Winblad B, Schultzberg M. Effects of statins on microglia. *J Neurosci Res.* 2005;82(1):10–9. doi: 10.1002/jnr.20615.

Lu Huaixiu, Xu M, Wang F, Liu S, Gu J, Lin S. Chronic stress enhances progression of periodontitis via α 1-adrenergic signaling: a potential target for periodontal disease therapy. *Exp Mol Med.* 2014a;46:e118. doi: 10.1038/emm.2014.65.

Lu H, Xu M, Wang F, Liu S, Gu J, Lin S. Chronic stress enhances progression of periodontitis via α 1-adrenergic signaling: a potential target for periodontal disease therapy. *Exp Mol Med.* 2014b;46(10). doi: 10.1038/EMM.2014.65.

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;90(1):29–35. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.08.021.

Minhoto GB, Khoury RD, Orozco EIF, Prado RF, Valera MC. Effect of chronic unpredictable stress on the progression of experimental apical periodontitis in rats. *Int Endod J.* 2021;54(8):1342–52. doi: 10.1111/iej.13515.

Naserzadeh R, Abad N, Ghorbanzadeh B, Dolatshahi M, Mansouri MT. Simvastatin exerts antidepressant-like activity in mouse forced swimming test: Role of NO-cGMP-KATP channels pathway and PPAR-gamma receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 2019;180:92–100. doi: 10.1016/j.pbb.2019.03.002.

Okada Y, Hamada N, Kim Y, Takahashi Y, Sasaguri K, Ozono S, et al. Blockade of sympathetic β -receptors inhibits *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in an experimental rat periodontitis model. *Arch Oral Biol.* 2010;55(7):502–8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.04.002.

Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Choi DC, Richtand NM, Herman JP. Hypoactivity of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis during Recovery from Chronic Variable Stress. *Endocrinology.* 2006;147(4):2008–17. doi: 10.1210/en.2005-1041.

Papakostas GI, Petersen T, Sonawalla SB, Merens W, Iosifescu D V., Alpert JE, et al. Serum cholesterol in treatment-resistant depression. *Neuropsychobiology.* 2003;47(3):146–51. doi: 10.1159/000070584.

Parsaik AK, Singh B, Hassan Murad M, Singh K, Mascarenhas SS, Williams MD, et al. Statins use and risk of depression: A systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord*. 2014;160:62–7. doi: 10.1016/j.jad.2013.11.026.

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;24(3):525–9. doi: 10.1016/0091-3057(86)90552-6.

Pérez-Losada F de L, Estrugo-Devesa A, Castellanos-Cosano L, Segura-Egea JJ, López-López J, Velasco-Ortega E. Apical periodontitis and diabetes mellitus type 2: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Med*. 2020;9(2):540. doi: 10.3390/jcm9020540.

Peruzzo DC, Benatti BB, Ambrosano GMB, 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;78(8):1491–504. doi: 10.1902/jop.2007.060371.

Rodrigues W, Madeira M, Silva T da, Clemente-Napimoga J, Miguel C, Dias-da-Silva V, et al. Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. *Br J Pharmacol*. 2012;165(7):2140–51. doi: 10.1111/J.1476-5381.2011.01686.X.

Rosania AE, Low KG, McCormick CM, Rosania DA. Stress, depression, cortisol, and periodontal disease. *J Periodontol*. 2009;80(2):260–6. doi: 10.1902/jop.2009.080334.

Santos T, Baungratz M, Haskel S, Lima D de, Cruz JN da, Magro D, et al. Behavioral interactions of simvastatin and fluoxetine in tests of anxiety and depression. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2012;8:413–22. doi: 10.2147/NDT.S31714.

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

Scarpato RK, Dondoni L, Böttcher DE, Grecca FS, Figueiredo JAP, Batista EL. 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;38(4):449–53. doi: 10.1016/j.joen.2011.12.041.

Segura-Egea JJ, Cabanillas-Balsera D, Jiménez-Sánchez MC, Martín-González J. Endodontics and diabetes: association versus causation. *Int Endod J*. 2019;52(6):790–802. doi: 10.1111/iej.13079.

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

Shadmehr E, Khademi A. Effect of Simvastatin on kinetics of Osteoprotegerin/receptor activator nuclear kappa B Ligand mRNA expression in periapical lesions. *Int Endod J*. 2013;46(11):1077–82. doi: 10.1111/iej.12101.

Siqueira JF, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J*. 2007;18(4):267–80. doi: 10.1590/s0103-64402007000400001.

Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J endod*. 1992;18(9). doi: 10.1016/S0099-2399(06)80841-1.

Thakur T, Gulati K, Rai N, Ray A. Experimental studies on possible regulatory role of nitric oxide on the differential effects of chronic predictable and unpredictable stress on adaptive immune responses. *Int Immunopharmacol*. 2017;50:236–42. doi: 10.1016/J.INTIMP.2017.07.002.

Trow JE, Jones AM, McDonald RJ. Comparison of the effects of repeated exposures to predictable or unpredictable stress on the behavioural expression of fear in a discriminative fear conditioning to context task. *Physiol Behav*. 2019;208. doi: 10.1016/j.physbeh.2019.05.017.

Vance JE. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech*. 2012;5(6):746–55. doi: 10.1242/DMM.010124.

Wang J, Li J, Sheng X, Zhao H, Cao XD, Wang YQ, et al. β -adrenoceptor mediated surgery-induced production of pro-inflammatory cytokines in rat microglia cells. *J Neuroimmunol*. 2010;223(1–2):77–83. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.04.006.

Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)*. 1997;134(4):319–29. doi: 10.1007/s002130050456.

Wohleb ES, Hanke ML, Corona AW, Powell ND, Stiner LM, Bailey MT, et al. β -Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. *J Neurosci*. 2011;31(17):6277–88. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0450-11.2011.

Yang C, Kok S, Wang H, Chang J, Lai E, Shun C, et al. Simvastatin alleviates bone resorption in apical periodontitis possibly by inhibition of mitophagy-related osteoblast apoptosis. *Int Endod J*. 2019;52(5):676–88. doi: 10.1111/IEJ.13055.

Yirmiya R, Goshen I, Bajayo A, Kreisel T, Feldman S, Tam J, et al. Depression induces bone loss through stimulation of the sympathetic nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(45):16876–81. doi: 10.1073/PNAS.0604234103.

Yokoyama T, Miyauchi K, Kurata T, Satoh H, Daida H. Inhibitory efficacy of pitavastatin on the early inflammatory response and neointimal thickening in a porcine coronary after stenting. *Atherosclerosis*. 2004;174(2):253–9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.01.039.

Young-Xu Y, Chan KA, Liao JK, Ravid S, Blatt CM. Long-term statin use and psychological well-being. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(4):690–7. doi: 10.1016/S0735-1097(03)00785-X.

Yu X Ben, Zhang HN, Dai Y, Zhou ZY, Xu R ai, Hu LF, et al. Simvastatin prevents and ameliorates depressive behaviors via neuroinflammatory regulation in mice. *J Affect Disord*. 2019;245:939–49. doi: 10.1016/j.jad.2018.11.086.

Zucchi FCR, Kirkland SW, Jadavji NM, van Waes LT, Klein A, Supina RD, et al. Predictable stress versus unpredictable stress: a comparison in a rodent model of stroke. *Behav Brain Res*. 2009;205(1):67–75. doi: 10.1016/J.BBR.2009.06.030.

ANEXO A —Comitê de ética em animais aprovado



CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 11/2020, intitulado: "Avaliação das diferentes metodologias de indução de estresse crônico em ratos e da ação da simvastatina nas periodontites apicais em animais submetidos ao estresse crônico" sob a responsabilidade de MARCIA CARNEIRO VALERA GARAKIS, tendo como colaboradoras: - Giovanna Mignoto, Gustavo Guimarães Guerrero e Rayana Duarte Khoury 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 19/10/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	19/10/2020 a 19/10/2023
Espécie/linhagem/raça	Ratos Heterogênicos Wistar
Nº de Animais	80 ratos
Peso/idade	90 dias / 300 grs
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 19 de outubro de 2020


Prof. Dra. CRISTIANE YUMI KOGA ITO
Vice-Coordenadora em exercício