



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

CAROLINA FEDEL GAGLIARDI

**PERFIL MICROBIANO INTRACANAL E PROCESSO INFLAMATÓRIO
PERIAPICAL DE RATOS SUBMETIDOS À RADIOTERAPIA DE
CABEÇA E PESCOÇO**

2023

CAROLINA FEDEL GAGLIARDI

**PERFIL MICROBIANO INTRACANAL PROCESSO INFLAMATÓRIO
PERIAPICAL DE RATOS SUBMETIDOS À RADIOTERAPIA DE CABEÇA
E PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE pelo programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL. Área: Endodontia. Linha de pesquisa: Patogenia, imaginologia e terapias em odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Tit. Marcia Carneiro Valera

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).

Fedel Gagliardi, Carolina

Perfil microbiano intracanal e processo inflamatório periapical de ratos submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço / Carolina Fedel Gagliardi. - São José dos Campos : [s.n.], 2023.
86 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2023.

Orientadora: Marcia Carneiro Valera.

1. Periodontite periapical. 2. Radiação ionizante. 3. Necrose da polpa dentária. 4. Tratamento do canal radicular. 5. Radioterapia. I. Carneiro Valera, Marcia, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

O estudo foi fundamental na endodontia, já que os protocolos de atendimento clínico para pacientes oncológicos são feitos sem estudos científicos que os amparem. Os estudos existentes são relatos de casos, acompanhamentos sem uma padronização e detalhamento dos procedimentos. Assim, esse estudo permitiu avaliar o efeito da radioterapia de cabeça e pescoço no desenvolvimento da periodontite apical em ratos.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The study was fundamental in endodontics, since clinical care protocols for cancer patients are carried out without scientific studies to support them. Existing studies are case reports, followed without standardization and detailing of procedures. Thus, this study allowed evaluating the effect of head and neck radiotherapy on the development of apical periodontitis in rats.

BANCA EXAMINADORA

Prof.Tit. Marcia Carneiro Valera (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr.Felipe Nogueira Anacleto

Universidade Anhanguera

Faculdade de Odontologia da Anhanguera

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 10 de fevereiro 2023.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, na pessoa da diretora do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Profa Assoc. Rebeca Di Nicoló e do vice-diretor Prof. Assoc. Cláudio Antonio Talge Carvalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal.

À Profa. Dra. Marcia Carneiro Valera, pela dedicação, pela amizade e pela paciência sempre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Mestrado no período 08/2021 a 02/2023.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.636677/2021-00.

À equipe da Biblioteca pela ajuda na elaboração deste trabalho, contribuindo com o acesso ao material bibliográfico e na orientação das normas. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo apoio e concessão da bolsa.

RESUMO

Gagliardi CF. Perfil microbiano intracanal e processo inflamatório periapical de ratos submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2023.

Pacientes que passam pela radioterapia (RT) no tratamento de tumores malignos de cabeça e pescoço podem ter efeitos adversos na cavidade bucal, especialmente nos dentes levando à instalação de cárie que pode atingir a cavidade pulpar evoluindo para necrose e desenvolvimentoda periodontite apical (PA). Até o presente momento não se conhece a evolução da PA, bem como a microbiota endodôntica intracanal após procedimentos de RT. Assim, este estudo propôs avaliar a PA induzida em ratos submetidos à RT analisando o volume e área da PA e o processo inflamatório periapical (parte1) e monitorando o perfil microbiano intracanal (parte 2). Parte 1: foram utilizados 40 ratos machos Wistar distribuídos em 4 grupos (n=10): PA: com indução da PA; RT-PA: aplicação da RT e indução da PA; RT: aplicação da RT; Controle: sem qualquer intervenção. Parte 2: foram utilizados 20 ratos machos Wistar distribuídos em 2 grupos(n=10): PA-TE: indução da PA e tratamento endodôntico (TE); RT-PA-TE: aplicação da RT, indução da PA e TE. Nos grupos RT, os animais foram submetidos a RT no dia 1 do experimento, com a dosagem de 15 Gy localizada no lado direito da face. A PA foi induzida no dia 7 através da exposição das cavidades pulpares dos primeiros molares ao meio oral por um período de 21 dias. Após 21 dias da indução da PA nos grupos de TE os canais foram preparados até a lima K# 30 associada à solução de hipoclorito de sódio 1%. Foram feitas coletas do canal radicular após abertura coronária (S1) e após preparo dos canais (S2), para avaliar o perfil microbiano intracanal. Os animais foram eutanasiados no dia 28 do experimento. Nos animais da Parte 1: foram realizadas análises comportamentais no início do experimento e no dia da eutanásia. Amostras foram submetidas às análises: radiográfica, microtomográfica e histológica e da expressão gênica de mediadores ósseos RANKL, OPG, TRAP. Parte 2: o conteúdo coletado dos canais foi avaliado por cultura (UFC/mL) utilizando meios seletivos para microorganismos anaeróbios facultativos e/ou aeróbios; anaeróbios; leveduras; espécies de enterococos; streptococos; Enterobactérias e estafilococos. Os resultados mostraram que o ganho de peso foi significativo menor nos animais submetidos a RT sendo o grupo PA-RT com menor ganho de peso. Verificou-se diminuição na movimentação média dos animais nos grupos com RT. No grupo RT-PA: A área e o volume da lesão periapical foi significativamente maior nas análises microtomográficas e radiográficas; Houve maior intensidade de extensão e intensidadedo infiltrado inflamatório. A expressão gênica de de OPG e TRAP foi alterada, influenciando no desenvolvimento da PA. A carga bacteriana foi principalmente composta por microrganismos anaeróbios facultativos, aeróbios, estreptococos e anaeróbios. O preparo biomecânico foi eficiente na redução do número de espécies bacterianas.

Palavras-chave: periodontite periapical; radiação ionizante; necrose da polpa dentária; tratamento do canal radicular; radioterapia.

ABSTRACT

Gagliardi CF. Intracanal microbial profile and periapical inflammatory process in rats manifested by head and neck radiotherapy [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2023.

Patients who undergo radiotherapy (RT) in the treatment of malignant head and neck tumors may have adverse effects on the oral cavity, especially on the teeth, leading to the installation of caries that can reach the pulp cavity, progressing to necrosis and development of apical periodontitis (AP). Until the present moment, the evolution of AP is not known, as well as the intracanal endodontic microbiota after RT procedures. Thus, this study proposed to evaluate the BP induced in rats submitted to RT by analyzing the volume and area of the PA and the periapical inflammatory process (part 1) and monitoring the intracanal microbial profile (part 2). Part 1: 40 male Wistar rats were used, divided into 4 groups (n=10): PA: with PA induction; RT- PA: RT application and BP induction; RT: RT application; Control: without any intervention. Part 2: 20 male Wistar rats distributed in 2 groups (n=10) were used: PA-TE: PA induction and endodontic treatment (ET); RT-PA-TE: application of RT, induction of PA and TE. In the RT groups, the animals were submitted to RT on day1 of the experiment, with the 15 Gy dose located on the right side of the face. PA was induced on day 7 by exposing the pulp cavities of the first molars to the oral medium for a period of 21 days. After 21 days of BP induction in the TE groups, the canals were prepared with a K# 30 file associated with a 1% sodium hypochlorite solution. Root canal samples were taken after coronal opening (S1) and after root canal preparation (S2), to evaluate the intracanal microbial profile. The animals were euthanized on day 28 of the experiment. In animals from Part 1: behavioral analyzes were performed at the beginning of the experiment and on the day of euthanasia. Samples were submitted to radiographic, microtomographic and histological analyses, and the expression of bone mediators RANKL, OPG, TRAP. Part 2: the content collected from the canals was evaluated by culture (CFU/mL) using selective media for facultative anaerobic and/or aerobic microorganisms; anaerobes; yeasts; species of enterococci; streptococci; Enterobacteriaceae and staphylococci. The results showed that the weight gain was significantly lower in the animals submitted to RT, with the PA-RT group having the lowest weight gain. There was a decrease in the average movement of the animals in the groups with RT. In the RT-PA group: The area and volume of the periapical lesion was significantly greater in the microtomographic and radiographic analyses; There was a greater intensity of extension and intensity of the inflammatory infiltrate. The gene expression of OPG and TRAP was altered, influencing the development of AP. The bacterial load was mainly composed of facultative anaerobic, aerobic, streptococcal and anaerobic microorganisms. The biomechanical preparation was efficient in reducing the number of bacterial species

Keywords: periapical periodontitis; ionizing radiation; dental pulp necrosis; root canal therapy; radiotherapy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço	15
2.2 Radioterapia: modalidades e radiobiologia.....	16
2.3 Alterações bucais associadas à radioterapia de cabeça e pescoço	17
2.4 Efeitos da radioterapia na polpa dentária e nos tecidos perirradiculares.....	19
3 PROPOSIÇÃO	25
3.1 Objetivos geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Animais.....	26
4.2 Cálculo amostral.....	27
4.3 Distribuição das amostras	27
4.4 Protocolo de RT	28
4.5 Protocolo de indução da lesão periapical	30
4.6 Coleta do interior dos canais e tratamento endodôntico: preparo biomecânico.....	31
4.7 Grupo controle.....	33
4.8 Uso de analgesia.....	33
4.9 Eutanásia.....	33
4.10 Análises parte 1	34
4.10.1 Análise comportamental.....	34
4.10.2 Análise radiográfica	36
4.10.3 Análise por microtomografia computadorizada (μ-CT).....	37
4.10.4 Análise histológica.....	40

4.10.5	Análise da expressão dos genes dos marcadores ósseos RANK, RANKL, OPG e TRAP: análise por RT-PCR.....	41
4.10.5.1	Extração de RNA.....	42
4.10.5.2	Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR).....	44
4.10.5.3	PCR em Tempo Real (qPCR)	44
4.11	Análises da parte 2	46
4.11.1	Análises microbiológica por cultura.....	46
4.12	Análises estatísticas	47
5	RESULTADO	48
5.1	Resultados da parte 1.....	48
5.1.1	Ganho de peso.....	48
5.1.2	Teste de campo aberto (open field).....	50
5.1.3	Teste em “y”	52
5.1.4	Análise radiográfica (mm ²)	55
5.1.5	Análise por microtomografia computadorizada (μ-CT).....	56
5.1.6	Análise Histológica.....	60
5.1.7	Avaliação da expressão gênica de biomarcadores da reabsorção óssea por RT-PCR	63
5.2	Resultados da parte 2.....	64
5.2.1	Análise microbiológica (UFC/mL).....	64
6	DISCUSSÃO	67
6.1	Discussão da parte 1	67
6.2	Discussão da parte 2	72
7	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS.....	75
	ANEXO.....	86

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas de cabeça e pescoço são compostas pelos tumores que acometem as regiões dos seios da face, laringe, esôfago, cavidade oral e tireoide. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento dessas doenças incluem o tabagismo e o consumo excessivo de álcool, sendo que o risco é 30 vezes maior para os indivíduos que fumam e bebem do que para aqueles indivíduos que não o fazem (American Cancer Society, 2019; Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019). Entre outros fatores de risco, encontra-se a exposição ao sol sem proteção, o excesso de gordura corporal e a infecção pelo HPV. No Brasil, segundo projeções do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2022) há registros de aproximadamente 41 mil novos casos de câncer de cabeça e pescoço a cada ano. Essas informações merecem grande atenção de todos os profissionais da área da saúde.

As condutas terapêuticas mais utilizadas no tratamento desses tumores incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sendo que o tratamento primário geralmente é a cirurgia e a radioterapia, enquanto a quimioterapia geralmente é utilizada como tratamento complementar. A radioterapia (RT) utiliza diversos equipamentos e técnicas a fim de irradiar áreas específicas com o objetivo de combater a proliferação das células neoplásicas. Por meio da aplicação de um feixe de radiação ionizante, a RT é capaz de destruir estas células (Medrado et al., 2015). No entanto, é comum que os pacientes que passam por RT apresentem algumas sequelas na região irradiada, o que afeta muito suas condições psicológicas, sociais e até profissionais. Por isso, há a necessidade de uma abordagem mais ampla e completa para esses indivíduos, incluindo uma equipe multidisciplinar, pois a atenção aos pacientes deve estar focada não somente na tentativa de cura do câncer, mas também na qualidade de vida desses pacientes ao final do tratamento oncológico (Tacani et al., 2017).

Nessas circunstâncias o tratamento odontológico é imprescindível, já que muitas consequências da RT podem ter manifestações na cavidade oral devido às alterações fisiológicas e histológicas dos tecidos bucais (Sønstevoid et al., 2015). A radiação tem capacidade de enfraquecer estruturas dentais, induzir a hipossalivação,

mucosites, cáries rampantes (Sroussi et al., 2017) e até a osteoradionecrose (ORN) que é uma complicação perniciosa na qual o paciente pode apresentar úlceras ou necrose da mucosa com exposição de osso necrótico, dor, trismo e supuração (Chronopoulos et al., 2018). Desse modo, no intuito de evitar tais desordens, o cirurgião dentista deve estar presente antes mesmo do paciente ser submetido a radiação, atuando com medidas profiláticas como orientação de higiene e controle de placa e até realizando procedimentos para remover os focos infecciosos quando os pacientes apresentarem tal necessidade.

A fim de apresentar atendimentos odontológicos específicos aos pacientes oncológicos submetidos à radiação, estudos elucidaram os efeitos da RT sobre glândulas salivares (Jensen et al., 2019), investigaram medidas preventivas e tratamento para osteonecrose (Gadiwalla, Patel 2018; Strojan et al., 2017), entretanto, ainda há uma lacuna na literatura com relação aos efeitos da RT na região periapical e no reparo ósseo após tratamento endodôntico.

É visto que o processo carioso caminha rapidamente após a radiação (Hommez et al., 2012) por isso, o sistema de canais radiculares pode ser exposto ao meio bucal em poucos meses levando a alterações pulpareas que podem avançar para necrose da polpa e ter como resultado inflamação perirradicular com formação de lesão periapical (Kakehashi et al., 1965). O que ocorre é que a radioterapia resulta em alterações na composição salivar, com aumento da viscosidade, redução da capacidade de tamponamento, alterações das concentrações de eletrólitos salivares e alteração dos sistemas antibacterianos. Além disso, o pH pós-irradiação cai em média de 7,0 para 5,0, favorecendo a desmineralização do esmalte e da dentina (Kielbassa, Schilli, 1997; Vissink et al., 2003).

Ainda, com o fluxo salivar reduzido ocorre diminuição de imunoproteínas da saliva na cavidade bucal. Simultaneamente, ocorrem alterações na microbiota oral com aumento de microrganismos acidogênicos e cariogênicos (Keene et al., 1981). Essas alterações ocorrem semanas após o início da radioterapia podendo permanecer muito tempo após a mesma.

Portanto, as alterações geradas pela hipossalivação e outras alterações como mudanças na microbiota, alterações químicas, imunológicas e até dietéticas, correspondem aos fatores relacionados ao desenvolvimento da “cárie de radiação” (Kielbassa, Schilli, 1997) que leva à destruição rápida do esmalte coronário da região

cervical, onde o cimento ou dentina estão diretamente expostos ao meio bucal (Gupta et al., 2015; Hommeez et al., 2012).

Além disto, a radiação ionizante leva a alterações inflamatórias e alterações isquêmicas, inclusive na polpa dentária seguidas por efeitos posteriores como fibrose e atrofia deste tecido (Shenoy et al., 2007). Daveswar et al. (2021) e Kataoka et al., (2016), identificaram por meio do teste de vitalidade pulpar utilizando oximetria de pulso que após a irradiação ocorre diminuição na oxigenação pulpar. Frente a essa alteração, o tecido pulpar tem sua capacidade de defesa diminuída o que o torna susceptível a necrose frente à agressão microbiana. Ressalta-se que a radiação por si só não causa necrose do tecido pulpar. Mas os tecidos alterados pela radiação, inclusive polpa, podem responder aos estímulos agressores, como cárie, de forma diferenciada quando comparado aos tecidos “normais”.

A patogênese da periodontite apical está relacionada à presença de microrganismos no sistema de canais radiculares. No geral, as infecções endodônticas são polimicrobianas compostas por bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, aeróbias e principalmente bactérias anaeróbias. Machado et al. (2021), verificaram que as infecções primárias possuem grande diversidade bacteriana que interagem entre si resultando em diferentes características (Machado et al., 2021). Outros autores verificaram que algumas bactérias anaeróbias gram-negativas estão intimamente associadas a lesões perirradiculares sintomáticas e assintomáticas (Carneiro et al., 2017; Haapasalo, 1993; Sakko et al., 2016)

No entanto, vários estudos mostram que durante o tratamento de dentes com polpa necrótica e infectadas associadas à periodontite apical deve-se levar em consideração a prevenção da introdução de novos microrganismos no sistema de canais radiculares, mas principalmente a eliminação dos microrganismos presentes (Siqueira JF Jr. et al., 2001). Sendo assim, o sucesso do tratamento endodôntico depende de quão efetivo for o tratamento em atingir esses objetivos (Sjogren et al., 1990).

A região periapical após a radiação ionizante tende a influenciar a rede lacunar dos osteócitos, na maturação do colágeno e na microarquitetura tecidual (Mendes et al., 2020), o que pode ter grandes impactos no reparo ósseo do tecido irradiado. Desde o início dos anos 80 existe uma preocupação eminente com o comprometimento no reparo ósseo na região periapical após a RT (Pitkänen, Hopewell, 1983). Contudo, até os dias de hoje esses fenômenos ainda não foram completamente elucidados,

principalmente na endodontia.

Castagnola et al. (2020) relataram uma série de casos clínicos de tratamentos endodônticos que obtiveram sucesso em pacientes que passaram por radiação. No entanto os pacientes tratados não tinham lesão periapical. Em outros poucos estudos existentes nesta área foi avaliado o índice de sucesso dos tratamentos endodônticos após radioterapia (Lilly et al., 1998) e também analisaramo efeito da dose de radiação da radioterapia oral (Hommez et al., 2012). Entretanto, nenhum desses estudos existentes conseguiu estabelecer uma conduta terapêuticaa ser seguida, inclusive indicam a necessidade de novos estudos prospectivos com esse objetivo.

Até o presente momento não se observam estudos clínicos controlados que avaliam a microbiota de canais radiculares de pacientes submetidos à radioterapia comparada a microbiota de pacientes que não foram expostos a radiação ionizante e, nenhum estudo avaliou essa microbiota em ratos. Diante disso, como o sucesso do tratamento depende dos procedimentos de desinfecção endodôntica, torna-se fundamental avaliar a microbiota presente nos canais radiculares de ratos submetidos à RT e a efetividade dos procedimentos endodônticos na eliminação da infecção.

Os poucos estudos existentes nesta área não apresentam critérios de avaliação bem definidos (Montgomery, 1977; Markitziu, Heling, 1981; Seto et al., 1985; Lilly et al., 1998) ou são estudos clínicos de resposta aos testes de vitalidade pulpar antes e após o tratamento de RT (Kataoka et al., 2011, 2012; 2016; Gupta el al., 2018; Daveswar et al., 2021) ou ainda são relatos de casos clínicos (Kielbassa et al., 1995, Castagnola et al., 2020), sem a definição do protocolo de tratamento endodôntico utilizado, o que compromete a extrapolação dos resultados de forma ampla. Além disso, um estudo de Cohort realizado por Huang et al. (2020), inferiu que a exposição à radiação pode interferir na cicatrização de lesões mecânicas, químicas e / ou microbianas na polpa ou tecido perirradicular e ressaltou a falta de estudos nesta área.

Assim, não se observa na literatura nenhum estudo padronizado e detalhado sobre o processo inflamatório periapical após radioterapia. Por isso, realizar estudo com esse propósito auxiliará na compreensão dos mecanismos de resposta inflamatória e desenvolvimento da infecção e o uso de modelo animal é adequado para esta finalidade. Um dos principais obstáculos para desenvolver um protocolo e melhores técnicas endodônticas é a dificuldade da execução de estudos clínicos randomizados com

pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço. As dificuldades vão desde a realização de alguns exames de imagem (radiografias, tomografias) pela condição do paciente que pode apresentar fibroses, trismos decorrentes da doença, até a impossibilidade de testar vários protocolos, já que isso poderia culminar em um possível desequilíbrio local entre resistência orgânica, patogenicidade e número de bactérias. Sendo assim torna-se importante realizar um estudo *in vivo* utilizando modelo animal. E, após estudos em animais, realizar estudos em humanos com maior confiabilidade e segurança, para pacientes oncológicos. Embora existam estudos que avaliam os efeitos da RT de cabeça e pescoço em ratos, nenhum estudo até agora avaliou esta relação na endodontia (Abedi et al., 2016; Özer et al., 2016; Kim et al., 2017; Xu et al., 2017; Akyuz et al., 2017; Araujo et al., 2018; Arıcıgil et al., 2018; Özgür et al., 2019; Elsaadany et al., 2019; Abdel-Magied et al., 2019; Hassan et al., 2020; Yamasaki et al., 2020).

Deste modo, o propósito deste trabalho foi avaliar em modelo animal a progressão da periodontite apical após a RT de cabeça e pescoço bem como avaliar a microbiota presente no interior dos canais radiculares antes e após preparo biomecânico em canais radiculares de ratos submetidos a RT.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão de literatura abordará as alterações que são provocadas pela RT na polpa dentária e na região periapical dos dentes. Além de detalhar: dados epidemiológicos sobre as neoplasias de cabeça e pescoço e tratamento com radioterapia. Assim essa revisão apresenta a estruturação conceitual com embasamento para o desenvolvimento da pesquisa.

2.1 Epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço

As neoplasias malignas de cabeça e pescoço são compostas pelos tumores que acometem uma variedade de regiões anatômicas, incluindo os seios da face, pele, laringe, nasofaringe, hipofaringe esôfago, cavidade oral, tireoide, seios paranasais e glândulas salivares. Essa categoria de neoplasias compreende a sexta posição no ranking das neoplasias mais comumente diagnosticadas em todo o mundo. Em 2020, foram estimados 931.931 novos casos da doença e 467.125 óbitos por todo o mundo (International Agency for Research on Cancer, 2021). Esses dados expressam a relevância da doença para a saúde pública.

A etiologia das neoplasias de cabeça e pescoço é multifatorial, mas os principais fatores de risco para o desenvolvimento dessas doenças incluem o tabagismo e o consumo excessivo de álcool, sendo que o risco é 30 vezes maior para os indivíduos que fumam e bebem do que para aqueles indivíduos que não o fazem (American Cancer Society, 2019; Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019). A interação desses dois fatores com outras variáveis, tais como dieta, exposição ao sol sem proteção, excesso de gordura corporal e a infecção pelo HPV caracterizam padrões particulares de incidência nas populações. Segundo Kfoury et al. (2018) a remoção de um dos dois fatores de riscos principais pode reduzir significativamente a quantidade de casos na população, por isso é fundamental a continuação e incentivo aos programas articulados para a redução do consumo exacerbado de álcool e tabaco.

É importante reconhecer que as variações nas condições socioeconômicas, culturais, educacionais e acessibilidade à assistência médica e odontológica das populações influenciam na prevalência desse tipo de câncer, já que os hábitos, cuidados, atitudes comportamentais e estilos de vida impactam no desenvolvimento dessas doenças nos indivíduos (Conway et al., 2015; Buss, Pellegrini, 2007).

No Brasil, infelizmente ainda existe uma precariedade no acesso ao serviço odontológico e médico do sistema público de saúde, principalmente nas regiões do Norte e Nordeste. As desigualdades no acesso aos serviços de saúde são ocasionadas pela carência e má distribuição geográfica e social de profissionais da saúde (Pierantoni et al., 2011), o que dificulta bastante às campanhas de prevenção e diagnósticos precoces das neoplasias em algumas regiões do país. Deste modo é fundamental o enfrentamento organizacional e político dessa grave questão no país.

2.2 Radioterapia: modalidades e radiobiologia

A RT é uma opção de tratamento para neoplasias de cabeça e pescoço, a qual pode ser utilizada isoladamente ou em combinação com quimioterapia e/ou ressecção cirúrgica do tumor (Gregoire et al., 2010). Segundo o A.C.Camargo Cancer Center (2022) existem algumas modalidades de radioterapias que são indicadas de acordo com o quadro clínico do paciente, são elas: neoadjuvante, curativa, adjuvante e paliativa. Sendo a radioterapia Neoadjuvante indicada para diminuir o volume do tumor, para posteriormente facilitar a cirurgia, possibilitar a preservação de estruturas e permitir que a cirurgia seja menos mutiladora. Já a Adjuvante é a radioterapia associada à quimioterapia ou à cirurgia. A Curativa quando a radioterapia é considerada o principal artifício no combate ao câncer, podendo ser associada à quimioterapia ou utilizada em casos nos quais a cirurgia não é possível ou muito arriscada para o paciente. E por fim a Paliativa que é utilizada para melhorar a qualidade de vida do paciente oncológico, propiciando melhora da dor, redução de sangramento ou de outros sintomas.

A grande vantagem da aplicação da RT está na possibilidade de preservação da função, uma vez que com o tratamento cirúrgico isolado, tecidos adjacentes saudáveis são inevitavelmente removidos. No entanto, a impossibilidade de isolamento da

massa tumoral durante a aplicação da RT, faz com que a toxicidade produzida pela radiação afete não só as células tumorais, como também os tecidos saudáveis, acarretando efeitos deletérios indesejáveis (Khan, 2003). Existe uma série de fatores que interferem nesses efeitos e no resultado clínico após a radioterapia, incluindo as propriedades biológicas da região do tumor e dos tecidos normais, bem como o tipo de radiação, o esquema de dosagem.

Para compreender melhor os resultados e possíveis sequelas da radioterapia é necessário entender seus aspectos biológicos, sendo assim a sua ação terapêutica é dada pelo emprego de radiações do tipo ionizantes com o objetivo de promover a morte ou inibir o crescimento de células anormais tumorais. O DNA nuclear é um dos principais alvos da radiação, assim, a quebra de sua fita de dupla hélice pode levar à morte celular ou à perda da sua capacidade reprodutiva. As células mais radiosensíveis são aquelas com alto grau de atividade mitótica, já que o conteúdo de DNA duplica durante a mitose. Por isso, por estarem em contínuo processo de multiplicação, as células neoplásicas são mais passíveis de sofrerem os efeitos da radiação. A ação da radiação ionizante pode ser direta ou indireta. Na ação direta, a molécula de DNA é clivada, o que interfere no processo de duplicação. Já no efeito indireto, a radiação cria radicais livres nas moléculas de H₂O, que são as mais atingidas pela radiação. Como a água representa a maior parte do conteúdo celular, o efeito indireto é proporcionalmente mais importante que o direto (Jham et al., 2006).

2.3 Alterações bucais associadas à radioterapia de cabeça e pescoço

Quando o assunto é radioterapia de cabeça e pescoço, é importante destacar que nem sempre é possível remover completamente a lesão tumoral ou o tumor pode se encontrar num sítio inadequado para cirurgia, por isso uma grande proporção de pacientes será submetida a radioterapia. Inevitavelmente alguns desses pacientes podem apresentar efeitos colaterais na cavidade oral inerentes à exposição à radiação, esses efeitos podem ser agudos ou tardios, e por serem bastante comuns e significativos requerem a ajuda de um profissional cirurgião-dentista (Ray-Chaudhuri et al., 2013).

As reações agudas são as que ocorrem durante o curso do tratamento, e continuam no pós-operatório imediato (2-3 semanas) e na maioria dos casos são reversíveis. Complicações tardias são consideradas mais sérias, já que podem ser irreversíveis, resultando em incapacidade permanente, prejudicial à qualidade de vida do indivíduo. Essas reações à radioterapia dependem tanto de condições associadas ao paciente como: idade, doenças preexistentes, condições clínicas e de higiene, quanto do tratamento radioterápico em si como: esquema terapêutico, dose total e fracionamento (Jham et al., 2006).

Estando ciente das taxas de incidência do câncer de cabeça e que a cavidade oral, principalmente pela sua taxa de renovação celular, é um local comum para consequências induzidas pela radiação, é de suma importância que profissionais da área de saúde estejam familiarizados com as principais complicações orais que podem advir do tratamento antineoplásico. Essas complicações afetam não somente a mucosa oral em si, mas as glândulas salivares adjacentes, o osso, a dentição, a musculatura e o aparelho mastigatório (Sciubba, Goldenberg, 2006), tendo como principais alterações as mucosites, a xerostomia, a candidose, a disgeusia, a cárie por radiação, a osteoradionecrose e a necrose em tecido mole.

A base destas alterações está relacionada à radiação ionizante, capaz de gerar radicais livres e danos às células endoteliais dentro do campo de tratamento. Com o tempo, isso leva à hipovascularidade, hipóxia tecidual, destruição de células formadoras de osso e fibrose medular (Sciubba, Goldenberg, 2006). Não é possível prever os danos que a radioterapia pode causar em um indivíduo, mas existem medidas profiláticas que podem ser utilizadas para minimizar essas consequências como exame odontológico completo (clínico e radiográfico), diagnóstico, adequação de meio bucal e tratamentos de doenças preexistentes. Além disso, existem alguns modificadores de respostas biológicas que podem ser associados como as drogas citoprotetoras, a radiação poupadora de tecidos e técnicas e avanços cirúrgicos que podem controlar complicações (Gupta et al., 2015).

2.4 Efeitos da radioterapia na polpa dentária e nos tecidos perirradiculares

As alterações pulpare causadas pela radioterapia direta ou indiretamente, ainda são bastante debatidas na literatura. Vale reforçar que a polpa dentária é um tecido dinâmico que pode apresentar reações inflamatórias a estímulos externos de várias maneiras. Essas respostas podem ser relacionadas a estímulos provocados por agentes microbianos, como pela exposição da polpa à cárie dentária, bem como ser provocadas por causas físicas ou traumáticas, por substâncias químicas aplicadas diretamente sobre a dentina, por estimulação elétrica e até pela utilização de irradiação. Na fase em que a inflamação da polpa ainda é reversível quando é removido o estímulo e devidamente tratadas suas consequências, a normalidade do tecido pulpar pode ser restabelecida (Dummer et al., 1980).

Entretanto as alterações pulpare tendem a ser agravadas quando ocorre uma contaminação microbiana associada a um agente inflamatório não microbiano, como a radiação ionizante, por exemplo, com grande chance de necessidade de intervenções endodônticas mais radicais.

Além disso, após as primeiras sessões com exposição a radiação ionizante a quantidade e arquitetura da saliva é alterada (Almståhl et al., 2015; Gaetti-Jardim et al., 2018; Müller et al., 2019), isso repercute em alterações na capacidade tampão e no pH da saliva, o que é capaz de provocar uma mudança na microbiota bucal, contribuindo para o crescimento de bactérias cariogênicas e favorecendo o aparecimento das lesões de cárie e mucosites (Almståhl et al., 2015; Gaetti-Jardim et al., 2018; Müller et al., 2019).

A cárie de radiação tem como característica alta severidade e rápida progressão expondo o sistema de canais radiculares ao meio bucal em um tempo mais curto (Hommez et al., 2012). Se não houver assistência odontológica e intervenção nessa fase, esse processo é capaz de evoluir para uma necrose tecidual com consequente formação de lesão periapical (Takehashi et al., 1965). Sendo assim, é comum que pacientes que realizam RT de cabeça e pescoço, principalmente os que não têm assistência multiprofissional com acompanhamento odontológico durante o tratamento, apresentem um aumento no desenvolvimento da periodontite apical (PA) (Hommez et

al., 2012).

Em condições em que ocorre a interação entre a radiação ionizante e as estruturas maxilofaciais existe uma exposição há riscos e possíveis danos em todos os tecidos envolvidos, principalmente o tecido ósseo, periósteo, tecido conjuntivo da mucosa e endotélio (Munhoz et al., 2021). As alterações na arquitetura óssea (Khojastepour et al., 2012; Mattos et al., 2019), bem como obliteração de pequenos vasos, diminuição do fluxo sanguíneo local, comprometem a capacidade de regeneração e cicatrização. Portanto, o que se espera é que a progressão da PA e reabsorção óssea perirradicular em pacientes pós-irradiados seja acentuada.

Foram encontrados na literatura estudos que desde os anos 80 vem considerando a indicação do tratamento endodôntico para pacientes que receberam RT de cabeça e pescoço e apresentam dentes com pulpites ou periodontites apicais, afim de evitar ou adiar a extração. No entanto os resultados dos estudos se mostraram bastante inconsistentes, Markitziu e Heling (1981) obtiveram uma baixa taxa de sucesso (18,1%) no tratamento dos pacientes irradiados tratados endodonticamente, sendo que os dentes tratados que responderem positivamente estavam fora do eixo principal do feixe de radiação. Nesses casos, os autores não usaram isolamento absoluto com lençol de borracha, a irrigação foi realizada com solução salina, as radiografias demonstraram que grande parte das obturações estavam aquém do ápice e não foi demonstrado nenhum selamento coronário após o tratamento. Todos estes detalhes poderiam explicar a alta taxa de falhas.

Seto et al. (1985) obtiveram um resultado diferente, mas ainda com uma baixa taxa de sucesso (40%) quando os critérios de sucesso foram definidos como alterações periapicais não progressivas e ausência de dor. No entanto, uma alta porcentagem de raízes (85%) foi mantida apesar de pequenas alterações periapicais e dor. Apesar das poucas expectativas de sucesso, os autores afirmam que preservar dente pode ser um meio viável de evitar a extração de dentes gravemente doentes dentro do campo de radiação para evitar o risco de desenvolvimento de ORN. E ainda sugerem que novos estudos devem ser desenvolvidos para refinar a técnica endodôntica para o tratamento desses pacientes.

Já no estudo de Lilly et al. (1998), foi demonstrada uma taxa de sucesso relativamente favorável (91%) no tratamento endodôntico após RT de cabeça e pescoço, diferenciando dos outros estudos que relataram um sucesso

consideravelmente menor. Esse resultado pode ser justificado pela técnica utilizada para o tratamento e pelo número relativamente baixo da amostra. Embora esse estudo tenha sido importante para mostrar que o tratamento endodôntico em pacientes previamente irradiados pode ser bem-sucedido, a técnica utilizada não foi detalhadamente descrita e com os avanços da endodontia moderna, essa técnica pode até ser complementada. Mais recentemente, Castagnola et al. (2020) obtiveram uma taxa de sucesso no tratamento de 100%, independentemente da dose de RT recebida e do tempo desde que os pacientes foram submetidos à cabeça e pescoço. No entanto não foram considerados dentes que tinham periodontite apical prévia e amostra era pequena. Foi utilizada técnica rotatória associada a obturação em cone único frio para evitar superaquecimento dos tecidos periapicais. Os autores ainda relacionaram a medição das doses de radiação periapical recebido por cada dente tratado e consideraram que aRT anterior não afetou o tratamento endodôntico. Mas consideram que um maior número de casos é necessário para avaliar a taxa de sucesso do tratamento endodôntico primário em pacientes irradiados e estabelecer uma correlação entre sucesso e dose de radiação.

Existem outros estudos (quadro 1) que avaliam a relação entre a RT e endodontia, demonstrando como os estudos já buscam correlacionar as alterações pulpares causadas por essa modalidade de tratamento para neoplasias de cabeça e pescoço. Os pacientes submetidos à RT podem ser expostos a vários problemas clínicos, a partir do desenvolvimento de doenças com comprometimento endodôntico, por isso mais endodontistas serão necessários no tratamento multidisciplinar desses pacientes, podendo desempenhar papel importante na prevenção do aparecimento de complicações mais sérias após RT de cabeça e pescoço.

Quadro 1 - Estudos da literatura que avaliaram a relação entre TE e RT de cabeça e pescoço

(continua)

Autor/ano	Tipo de estudo	Objetivo	Conclusões clínicas
Montgomery (1977)	Relato de Caso	Descrever complicações no TE de um paciente irradiado.	Descreve complicações como fibrose muscular e trismo e xerostomia
Markitziu e Heling (1981)	Estudo Longitudinal	Demonstrar o resultado do TE em duas pacientes, após radiação na região da cabeça e pescoço.	Uma avaliação longitudinal de 2 anos mostrou um processo de cicatrização alterado na área diretamente irradiada; Isso pode explicar a baixa taxa de sucesso (dois em onze dentes) nesses casos
Seto et al. (1985)	Estudo Clínico	Avaliar a aplicabilidade do TE no tratamento de doenças dentárias avançadas em 35 dentes de 16 pacientes submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço.	Apesar das poucas expectativas de sucesso devido à dificuldade técnica e de cicatrização, nenhuma ORN foi observada em associação com dentes que passaram por TE em 16 pacientes após RT de cabeça e pescoço.
Kielbassa et al. (1995)	Relato de Caso	Relatar a terapia de canal radicular em uma menina submetida à RT de cabeça e pescoço	O uso de hidróxido de cálcio para obturar os canais radiculares é um método viável de endodontia pós-irradiação em dentes decíduos.
Lilly et al. (1998)	Estudo Retrospectivo	Avaliar o sucesso do TE em 22 dentes em áreas de irradiação.	Dos 22 dentes tratados, 16 eram casos de necrose pulpar sendo 9 com PA e 4 de pulpite irreversível. Verificaram que 20 (91%) foram considerados bem-sucedidos. Não houve ocorrência de ORN.

Quadro 1 - Estudos da literatura que avaliaram a relação entre TE e RT de cabeça e pescoço

(continuação)

Autor/ ano	Tipo de Estudo	Objetivo	Conclusões clínicas
Hommez et al. (2012)	Estudo observacional	Analisar o efeito da dose de radiação da RT oral para câncer na PA.	Nas zonas com maior dose de RT, a inflamação do osso maxilar quando há infecção no canal radicular é mais provável de se desenvolver.
Hommez et al. (2008)	Estudo observacional	Coletar dados sobre a prevalência de PA em relação ao estado coronal dos dentes, em pacientes submetidos a RT de cabeça e pescoço e comparar esses números com dados de uma população geral	Apesar da maior incidência de PA em pacientes irradiados, não houve diferenças na prevalência da PA nestes pacientes quando comparada a população geral.
Kataoka et al. (2012)	Estudo clínico	Avaliaram os efeitos da RT administrada por 3D-RT ou RT modulada por intensidade (IMRT) na resposta ao teste de sensibilidade pulpar.	Concluíram que a RT diminuiu o número de dentes que respondem positivamente ao teste de sensibilidade ao frio e que o tipo de administração da RT não influencia as respostas pulpares ao teste.
Kataoka et al. (2016)	Estudo clínico	Avaliar os efeitos da RT na vitalidade pulpar medindo os níveis de oxigenação pulpar de 4-6 anos após o tratamento	Todos os dentes dos grupos RT e do grupo controle apresentaram resposta positiva ao teste térmico
Gupta et al. (2018)	Estudo clínico	Avaliar a sensibilidade pulpar de dentes posteriores após 4/6/12 meses em pacientes submetidos a RT de cabeça e pescoço	Nenhum dente respondeu ao teste de frio após 6 meses. Após 12 meses a sensibilidade pulpar observada foi progressivamente mais alta
Castagnola et al. (2020)	Série de casos	Avaliar o resultado do TE em 10 dentes sem PA de pacientes submetidos à RT de cabeça e pescoço e avaliar se houve ORN relacionado ao TE.	Após um seguimento médio de 277 dias, os 8 pacientes estavam assintomáticos, nenhum dente mostrou radiolusência periapical e nenhuma ORN foi observada.

Quadro 1 - Estudos da literatura que avaliaram a relação entre TE e RT de cabeça e pescoço

(conclusão)

Autor/ano	Tipo de Estudo	Objetivo	Conclusões clínicas
Huang et al. (2020)	Estudo de Cohort	Determinar a associação entre: momento da realização de terapias odontológicas e o risco de ORN em pacientes com câncer oral.	O TE dentro de 2 semanas a 1 mês antes da radioterapia aumentou o risco de ORN em 5,83 vezes
Daveshwar et al. (2021)	Estudo clínico	Avaliaram a vitalidade pulpar por oximetria de pulso, antes, ao final da RT e seis meses após a RT em pacientes com câncer de orofaringe	Verificaram que ocorre redução estatisticamente significativa no nível médio de SpO2 pós-RT, que se recupera após 6 meses. Recomendaram que estudos devam ser realizados por períodos mais longos.

Fonte: elaborada pela autora.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos geral

Este estudo *in vivo* laboratorial foi conduzido com objetivo de:

- Avaliar a progressão da PA induzida, em ratos Wistar submetidos ou não a RT de cabeça e pescoço.
- Avaliar o perfil e a carga microbiana inicial e após preparo dos canais de ratos Wistar submetidos ou não a RT de cabeça e pescoço.

3.2 Objetivos específicos

Parte 1: Para avaliar a progressão da PA induzida, bem como o processo inflamatório em ratos submetidos à RT de cabeça e pescoço e comparar com controles que não receberam a RT. Foram avaliados:

- O peso dos animais e alterações comportamentais que avaliou as condições de estresse (“emocionais”) dos animais submetidos à RT;
- A área da PA por meio da RX e o volume da PA por meio de MICRO-CT em ratos que foram submetidos ou não à RT de cabeça e pescoço;
- O grau do infiltrado inflamatório presente na PA induzida em ratos submetidos ou não à RT de cabeça e pescoço, por meio das análises histológicas.
- A expressão de TRAP, RANK-L e OPG, envolvidas no metabolismo ósseo, na região periapical.

Parte 2: Para avaliar o perfil microbiológico, foram avaliados:

- O perfil microbiano por meio de cultura antes e após o PBM dos canais. Utilizando meios específicos para microrganismos: anaeróbios facultativos e aeróbios; Anaeróbios estritos; Enterococos; Estreptococos; Estafilococos; Leveduras.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa seguiu rigorosamente as diretrizes estabelecidas na Lei Federal no 11.794, de 9 de outubro de 2008, a qual determina as regras sobre o uso de animais em experimentos científicos.

4.1 Animais

O projeto foi encaminhado e aprovado para apreciação pelo ANEXO(CEUA) do Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus de São José dos Campos/UNESP, instituição credenciada ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (Protocolo 04/2020).

Foram utilizados ratos imunocompetentes do gênero masculino da linhagem Wistar com 60 dias de idade e pesando cerca de 300g provenientes do Biotério Central da UNESP. Esses animais foram mantidos em gaiolas (5 animais/gaiola), em temperatura controlada ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12:00 h (luzes acesas às 07:00h; luzes apagadas às 19:00h) no Biotério do ICT São José dos Campos/UNESP. A dieta foi realizada com ração moída e água filtrada ad libitum e aguardaram um período de 30 dias para adaptação ao novo ambiente.

No ambiente de manutenção dos animais nenhum procedimento experimental foi realizado, no intuito de impedir que ocorresse qualquer tipo de estresse comportamental nos ratos. Todos os experimentos foram realizados entre 8:00h e 18:00h e no decorrer dos procedimentos experimentais, a temperatura do laboratório foi mantida em $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e s utilizado um período de adaptação ao novo ambiente de pelo menos uma hora.

4.2 Cálculo amostral

O cálculo do número adequado de animais por grupo experimental baseou-se nos dados de um trabalho de Pinto et al. (2020) que considerava:

- Grupo controle: área de reabsorção óssea média de 3,39 (± 0.61)
- Grupo experimental: área de reabsorção óssea média de 5,40 (± 1.27),
- α estabelecido em 0,05 para determinar o nível de significância estatística e um poder de 80%.

Com essas referências o número mínimo de 8 animais por grupo foi considerado necessário. Pensando na possibilidade da perda de amostra durante o estudo, foi planejado um aumento de 20% no número de animais, totalizando 60 animais que foram divididos em 6 grupos ($n=10$). Como recurso para realizar esse cálculo amostral foi utilizado o programa Sealed Envelope (www.sealedenvelope.com).

4.3 Distribuição das amostras

No total, foram envolvidos 60 animais para realização do estudo que foram submetidos protocolos de tratamento conforme os quadros abaixo (Quadro 2 e 3). A distribuição dos animais foi conduzida de forma aleatória e em bloco, compreendendo seis grupos, cada um com um $n=10$.

Quadro 2 - Distribuição dos espécimes nos grupos para as análises da parte 1

Grupos	N	Radiação (RT)	Periodontite apical (PA)
RT-PA	10	RT	PA
PA	10	-	PA
RT	10	RT	-
CONTROLE	10	-	-

Fonte: Elaborada pela autora.

Quadro 3 - Distribuição dos espécimes nos grupos para para as análises da parte 2

Grupos	N	Radiação (RT)	Periodontite apical (PA)	Tratamento endodôntico (TE)
RT-PA-TE	10	RT	PA	TE
PA-TE	10	-	PA	TE

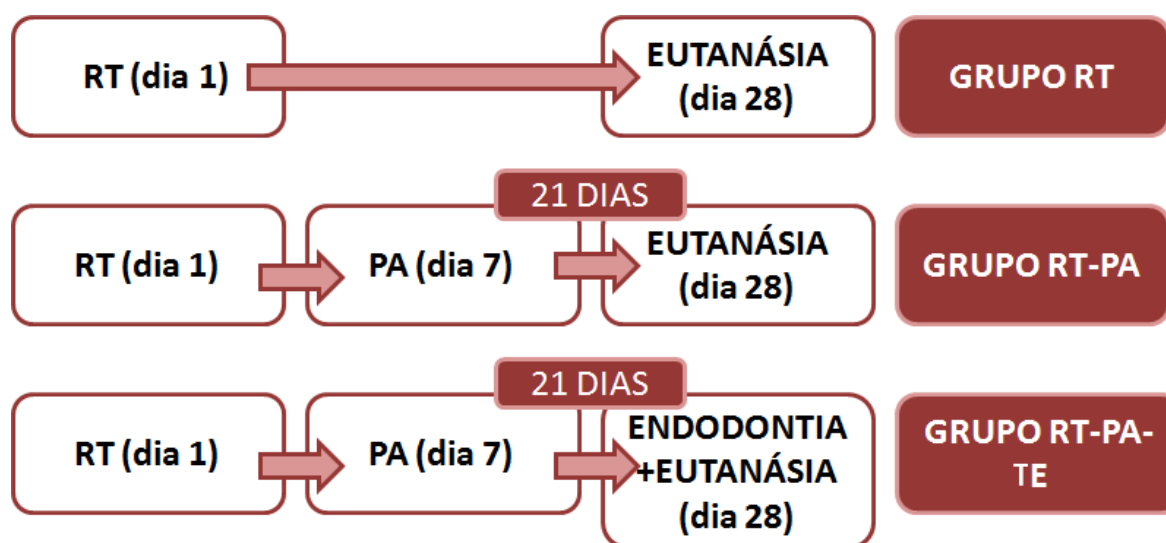
Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Protocolo de RT

Os animais dos grupos RT-PA-E, RT-PA, RT foram irradiados no primeiro dia do experimento (Figura 1). Para isso receberam anestesia através da administração intramuscular de uma combinação de xilazina 2% (10 mg/kg Anasedan; Ceva Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brazil) e Cetamina 10% (100 mg/kg peso, Dopalen; Ceva Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brazil). Os ratos dos respectivos grupos foram irradiados

na região da face direita com uma dose de 15 Gy.

Figura 1 - Representação esquemática do experimento nos grupos que receberão a RT



Fonte: Elaborada pela autora.

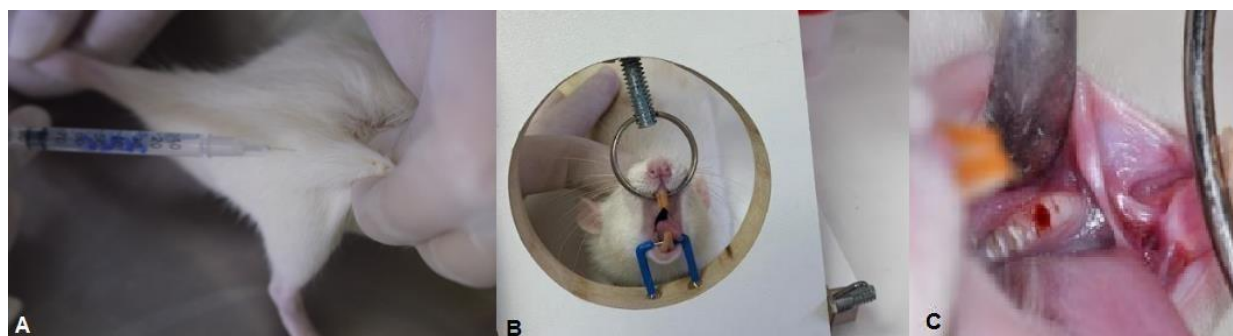
Para aplicação da RT o aparelho utilizado foi o modelo Eldorado 78 (Atomic Energy of Canadian Limited), o qual utiliza uma fonte de radiação gama proveniente de cobalto-60, localizado no Instituto de Estudos Avançados (IEAv) do Departamento de Ciência e Tecnologia Aeroespacial (DCTA), em São José dos Campos, São Paulo. O aparelho em questão tem seu efeito radiobiológico expresso em EBR e é constituído por fótons e elétrons na faixa de energia acima de 1 MeV, que é a faixa utilizada pelos aceleradores lineares (LINACs). O transporte UNESP - IEAV seguiu rigorosamente a legislação e os procedimentos para o bem-estar dos animais, bem como a emissão da Guia de Transporte Animal (GTA).

4.5 Protocolo de indução da lesão periapical

Após 7 dias de radioterapia foi induzida a periodontite apical (PA) conforme a figura 2. Para isso foi realizada a abertura coronária dos primeiros molares inferiores (lado direito) a fim de permitir o desenvolvimento da PA em todos os grupos correspondentes. A metodologia utilizada seguiu trabalhos publicados pelo nosso grupo (Khoury et al., 2020; Minhoto et al., 2021)

Os animais foram anestesiados através da administração intramuscular de uma combinação de xilazina 2% (10 mg/kg Anasedan; Ceva Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brazil) e cetamina 10% (100 mg/kg peso, Dopalen; Ceva Saúde Animal Ltda, São Paulo, Brazil). A abertura coronária foi realizada com brocas #1011HL (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) (1/4 mm de diâmetro da broca) com refrigeração constante. As câmaras pulpaes foram deixadas expostas ao meio bucal para permitir o desenvolvimento da PA.

Figura 2- Imagem representativas do protocolo de indução da periodontite apical nos grupos experimentais



Legenda: A) Anestesia intraperitoneal; B) Posicionamento do animal com dispositivo de abertura de boca; C) Abertura coronária, exposição da cavidade pulpar e extirpação do remanescente pulpar.

Fonte elaborada pela autora.

4.6 Coleta do interior dos canais e tratamento endodôntico: preparo biomecânico

Os procedimentos de tratamento endodôntico nos dentes de rato foram realizados utilizando microscópio cirúrgico. Foram realizadas coletas do conteúdo do interior dos canais méso-vestibulares após 21 dias da indução da PA (S1) e após o preparo dos canais (S2). Para isso, os animais dos grupos PA-TE; RT-PA-TE foram anestesiados conforme a técnica descrita anteriormente. As aberturas coronárias já realizadas foram limpas a fim de remover resíduos de ração e expor os canais radiculares. Foi então realizado o isolamento do campo operatório. Os dentes foram isolados relativamente com auxílio de dois operadores para afastamento de tecidos adjacentes. Foi realizada a profilaxia com pasta de pedra Pomes (Biodinâmica, Ibiporã-PR, Brasil) e escova de Robinson (MK life, Porto Alegre-RS, Brasil), sem refrigeração e o excesso de pasta foi removido com irrigação com solução salina fisiológica estéril e apirogênica. Foi feita a desinfecção do dente com peróxido de hidrogênio 30% + solução de hipoclorito de sódio 5,25% (30 segundos), seguido de neutralização da solução com tiosulfato de sódio 5%. Foi realizada a verificação do acesso ao canal radicular, visto que as câmaras pulpares eventualmente tinham obstruções. Em seguida os canais foram preenchidos com solução salina estéril apirogênica e seu conteúdo agitado com uma lima K #10 (Dentsply Sirona, Ballaigues, Suíça). Após, houve a remoção de todo conteúdo do interior dos canais com o auxílio de uma micropipeta. Esse conteúdo foi armazenado em um microtubo contendo meio reduzido VMGAII. Esse processo foi repetido por 5 vezes em cada dente e em seguida as limas utilizadas na agitação foram cortadas a 4 mm com um alicate ortodôntico estéril (Quinelato, Rio Claro-SP, Brasil) correspondente à profundidade inserida no canal radicular e também foram transferidas para outros microtubos contendo VMGA II para posteriores análises.

O preparo biomecânico (PBM) foi realizado nos molares expostos inferiores do lado direito nos grupos PA-TE e RT-PA-TE. O PBM foi realizado com limas manuais tipo K, até a lima de calibre #30 (Dentsply Maillefer, São Paulo, Brasil), no comprimento de trabalho definido em 4mm, conforme a anatomia dos primeiros molares inferiores de ratos e de acordo com treinamento prévio em laboratório (figura 3).

Figura 3- Treinamento prévio realizado em molares extraídos de ratos para definir o comprimento de trabalho



Fonte: Elaborada pela autora.

A cada troca de instrumento, o canal foi irrigado com 0,2 ml de hipoclorito de sódio 1% (NaOCl) (ASFER Indústria Química, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil) e foi feita a irrigação final com 1 ml de NaOCl 1%. Em seguida, os canais foram preenchidos com solução de EDTA 17% durante 5 minutos e lavados com 1 ml de NaOCl 1%. Após esse período foi feita a lavagem final com 2 mL de soro fisiológico estéril e apirogênico para proceder a segunda coleta do conteúdo do canal (S2) conforme a primeira coleta descrita acima. Todos os procedimentos do tratamento endodôntico foram realizados por um endodontista calibrado, com auxílio de um microscópio, sendo o mesmo operador para todos os grupos experimentais.

4.7 Grupo controle

Os animais do grupo Controle estiveram no mesmo ambiente em que os demais grupos, mas sem receber indução de lesão ou tratamento. Eles foram utilizados para comparação quanto ao desenvolvimento de uma possível alteração periapical devido ao estresse do confinamento (Khoury et al., 2020; Chen et al., 2019), e ficaram aguardando a eutanásia após 28 dias do início do experimento.

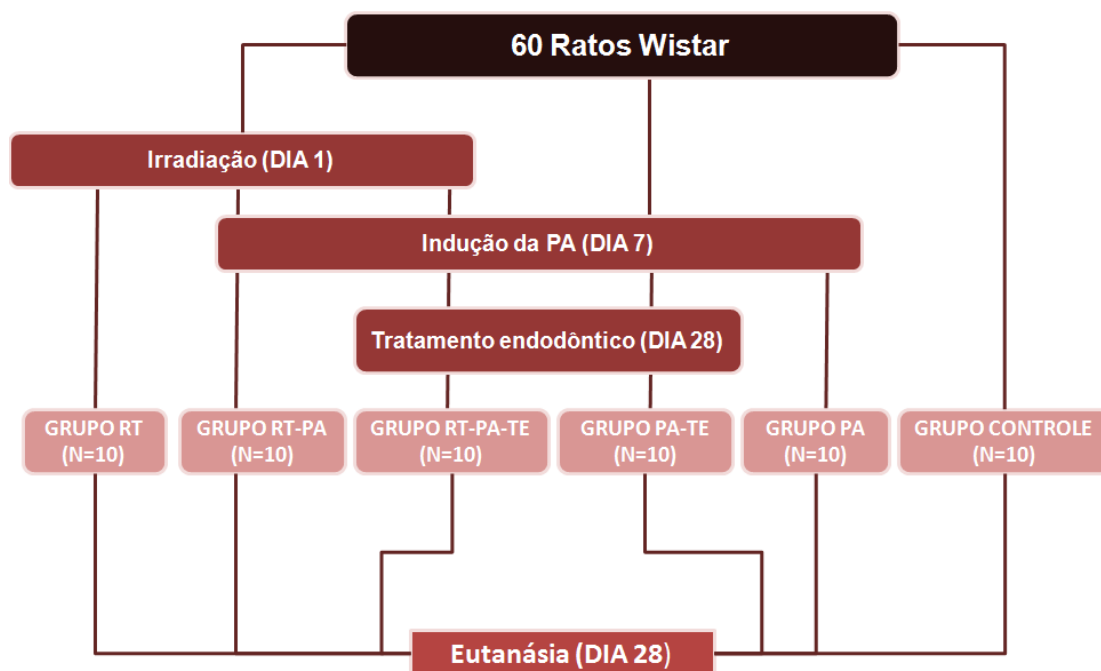
4.8 Uso de analgesia

Considerando a invasividade dos procedimentos e grau de dor gerado, o uso de opióides foi indicado nos animais submetidos que receberam RT e/ou PA e/ou TE. Para esses animais foi administrada a medicação Tramal 7 mg/kg a cada 24 horas, via oral, durante 3 dias.

4.9 Eutanásia

Passados 28 dias desde o início do experimento todos os animais dos grupos: controle, RT, PA, RT-PA, PA-TE e RT-PA-TE foram eutanasiados conforme a figura 4, através da sobredosagem anestésica. Após a eutanásia, as mandíbulas do lado direito e esquerda foram ressecados, dissecados e fixados em solução de formaldeído a 4% durante 48h. As peças foram encaminhadas para processamento e para as diferentes análises. A figura 4 ilustra as diferentes etapas do experimento.

Figura 4- Representação esquemática dos momentos de cada procedimento até a eutanásia



Fonte: Elaborada pela autora.

4.10 Análises parte 1

4.10.1 Análise comportamental

As análises foram realizada em dois momentos: 1) ao início do experimento; 2) antes da eutanásia. Para isso, os animais foram levados para a sala de experimentos 30 minutos antes dos testes comportamentais que foram realizados com o princípio de duplo-cego. Os animais passaram pelos testes de acordo com o quadro 4.

Quadro 4- Ordem dos testes comportamentais aplicados com o princípio de duplo-cego

PESO CORPORAL	Foi realizada pesagem dos animais no início do experimento e no momento da eutanásia; Cada animal foi pesado em balança digital e o percentual de alteração do peso de cada um dos animais foi calculado (Figura 5A)
TESTE DE CAMPO ABERTO	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. Registramos 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 realizado a análise por 3 minutos (Lotan et al., 2018; Song W et al., 2018) (Figura 5B)
TESTE DO 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 é utilizado para analisar se a capacidade exploratória do animal está alterada. O número de entradas foi contado por rato: uma entrada exige que ambas as patas traseiras atravessem totalmente a linha divisória da entrada do braço. (Figura 5C)

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 5 - Dispositivos utilizados para análise comportamental



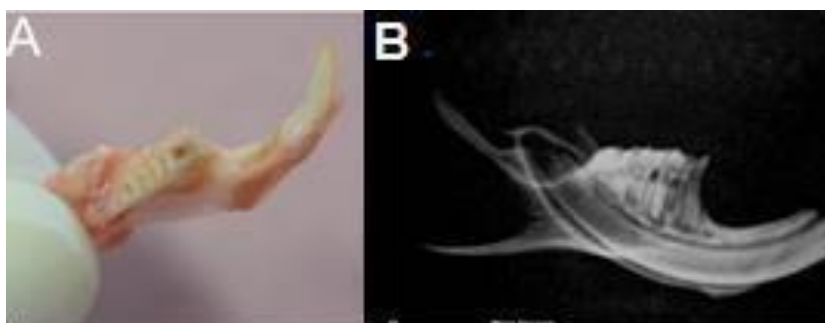
Legenda: Para realização da(o): A) Pesagem corporal; B) Teste de campo aberto (Open field); C) Teste do labirinto ("Y" maze).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.10.2 Análise radiográfica

Após a eutanásia, radiografias periapicais digitais foram obtidas de forma padronizada para determinar o diâmetro das lesões periapicais. Para isso, um sensor digital (Imagem Dental Master Fit, BR) foi utilizado e o aparelho de RX (Microimagem) foi posicionado perpendicularmente a uma distância de 30 cm do conjunto mandíbula/filme com tempo de exposição de 0,2 segundos, conforme a figura 6.

Figura 6 - Imagens representando a mandíbula antes e após ser submetida ao RX



Legenda: A) mandíbula após a dissecação; B) radiografia da mandíbula realizada com sensor digital e aparelho de RX.

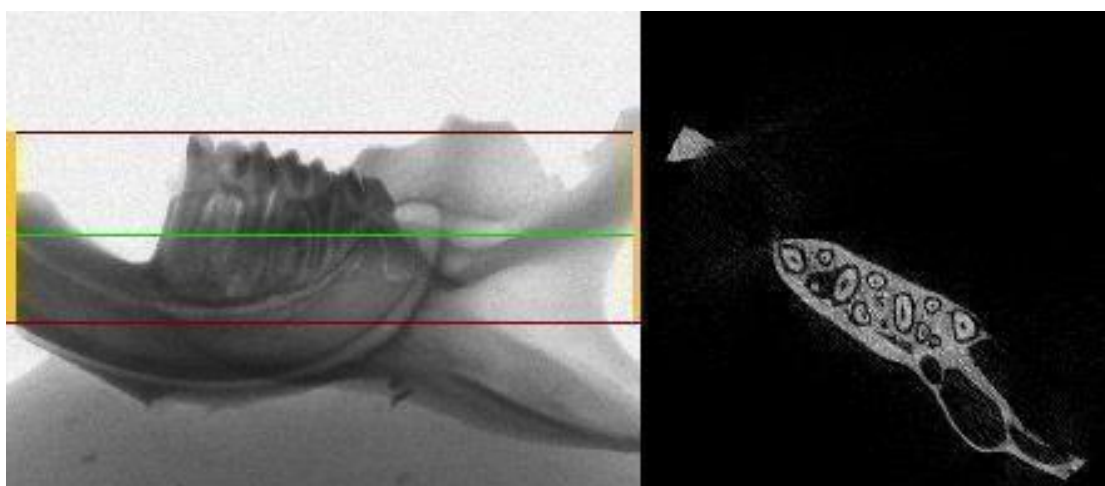
Fonte elaborada pela autora.

Com o auxílio do programa ImageJ, um endodontista cegado para os grupos experimentais realizou a análise das radiografias. O tamanho das lesões foi medido delimitando a área em mm², a área de interesse utilizada foi a área da lesão periapical associada a raiz mesial do primeiro molar mandibular, realizou-se o delineamento manual do limite da lesão, considerando a superfície externa do cimento, o ligamento periodontal e a superfície externa do osso alveolar.

4.10.3 Análise por microtomografia computadorizada (μ -CT)

Para realização da análise microtomográfica foi utilizado um aparelho modelo 1176 da fabricante SkyScan® (SkyScan 1176 in vivo, Skyscan, Kontich, Belgium) e então, após a fixação, as hemimandíbulas de cada grupo experimental foi preparada para escaneamento microtomográfico. As peças foram posicionadas e fixadas no porta-amostra apropriado para o equipamento, presas no meio de um isopor cilíndrico bipartido envoltas por papel absorvente úmido, possibilitando a estabilização a fim de prevenir qualquer tipo de movimentação durante o escaneamento e mantendo a umidade da peça. O escaneamento das amostras foi padronizado com um tamanho de voxel isotrópico de 18 μ m, 50 kV, 500 μ A, em 180°, ângulo de rotação de 0.0120 e filtro de Al 0,5 mm com tempo de exposição de 380 milissegundos ou seja 0,5s, utilizando um filtro de alumínio de 0,5 mm 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 conforme a Figura 7.

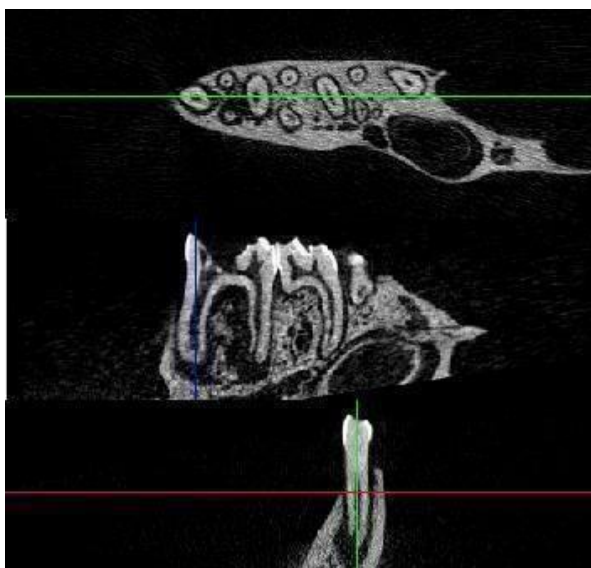
Figura 7 - Programa NRECON para reconstrução das imagens e seleção da área de interesse



Fonte: Elaborada pela autora.

O programa DataView® foi utilizado para visualização e avaliação em 2D (medidas lineares) dos eixos sagital, coronal e axial. A linha verde representa o eixo Y, a linha azul o Eixo X, e a linha vermelha o eixo Z. As imagens foram posicionadas de forma que cada eixo ficasse paralelo a raiz mesial no plano sagitale coronal, e que de forma automatica se ajusta ao centro da raiz mesial no plano axial conforme a figura 8.

Figura 8 – Programa DATAVIEWER para ajuste de imagem e delimitação dos planos. Imagens foram posicionadas de modo que cada eixo ficou paralelo a raiz mesial no plano sagital e coronal

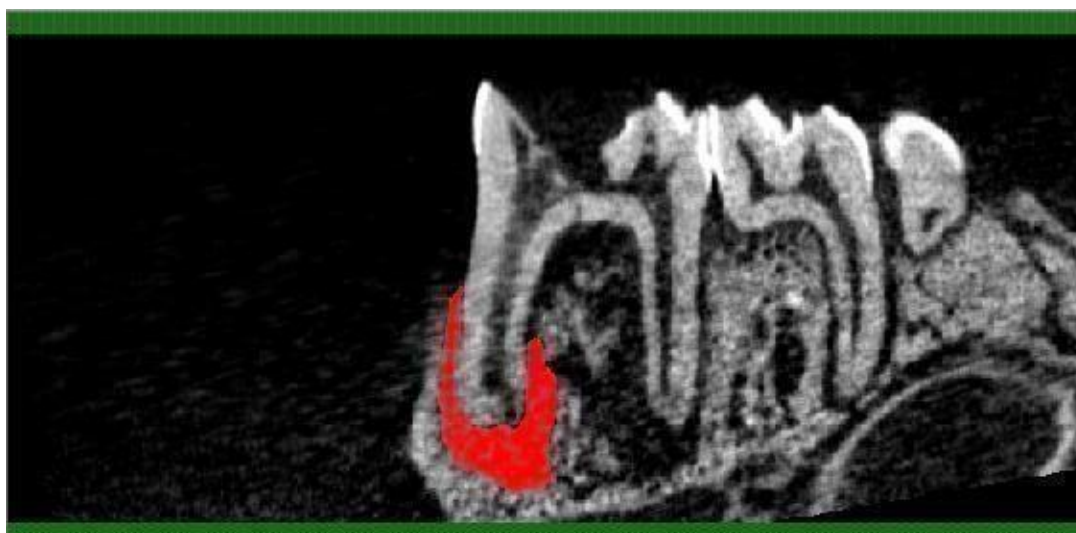


Fonte: Elaborada pela autora.

Para as análises volumétricas foi escolhido um eixo de interesse (sagital) e utilizado um programa específico de análise 3D (CTan®). O objetivo das análises volumétricas (3D) é quantificar o volume do osso alveolar na região do periápice, para tanto, foi escolhido como ponto central corte (slice) o local onde a lesão periapical apareceu em sua maior extensão. O ponto final da seleção foi determinado em 50 slices no sentido vestibulo lingual e 50 slices no sentido linguo 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 (Figura 9). Utilizou-se o ROI personalizado afim de permitir um delineamento manual da lesão periapical fornecendo um tamanho mais preciso do volume da reabsorção óssea. Todos os cálculos foram realizados sobre a região de interesses selecionada. 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 (BV) 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 9- Imagem tomográfica ilustrativa em corte sagital da região de interesse (ROI) em vermelho, delimitada manualmente de forma personalizada



Fonte: Elaborada pelo autora.

4.10.4 Análise histológica

As hemi-mandíbulas direitas de cada grupo foram desmineralizadas em solução de EDTA (etilenodinitrilotetracético - TITRIPLEX III- Merck) por 5 meses. Após desmineralizadas, as peças foram lavadas abundantemente em água corrente e submetidas à técnica histológica de rotina para inclusão em parafina. Foram realizados cortes semiseriados, de forma que o primeiro corte a ser considerado para análise fosse o primeiro que aparecer 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. Foi obtida uma imagem digital (formato JPEG) em aumento de 4x (1 imagem) e 40x (10 imagens). Posteriormente, as lâminas foram avaliadas morfolologicamente 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. Os dados obtidos nas análises histológica e histomorfométrica foram anotados em tabelas para posteriormente serem analisados estatisticamente.

Para análise histomorfométrica foi verificado 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 score 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 300 µm de comprimento), score 2 (células ocupando 300 µm de comprimento), score 3 (células ocupando até 600 µm de comprimento) e score 4 (células ocupando um comprimento > 600 µm) (Khoury et al., 2020).

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 expresso em mm².

4.10.5 Análise da expressão dos genes dos marcadores ósseos RANKL, OPG e TRAP: análise por RT-PCR

Amostras de tecido ósseo da região periapical foram cuidadosamente coletadas no dia da eutanásia, selecionando toda raiz méso-vestibular e região periapical de interesse, e foram armazenadas em solução de RNAlater (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) à -80°C. Posteriormente, as amostras de tecido ósseo foram pulverizadas através de moagem sob baixa temperatura e foram submetidas à avaliação da expressão dos genes RANKL, OPG e TRAP, em relação ao gene de referência (GAPDH) que foi definido como padrão. As sequências dos iniciadores foram confirmadas no site do NCBI/ Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). O RNA foi extraído utilizando solução de Trizol (Ambion, Inc, AM1926, Waltham, MA, EUA) e após essa etapa foi transcrito para cDNA utilizando o Kit SuperScript™ III First- Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foi realizada utilizando o Kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG – Invitrogen e os microtubos foram incubados em um termociclador (LineGene K- Bioer Technology). As reações de quantificação foram realizadas de acordo com as condições e parâmetros descritos para cada gene alvo. Os primers utilizados para amplificar as regiões dos genes alvos, bem como o gene de referência estão descritos no Quadro 5.

Quadro 5 - Primers utilizados para amplificar as regiões dos genes alvos RANKL, OPG e TRAP e do gene de referência (GAPDH)

Gene	Sequência 5'-3'	Tm*	Bp	Referência FASTA PUBMED
GAPDH (Gapdh)	GATGCTGGTGCTGAGTATGTCTG GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA	61.37 63.98	197	NM_017008.4
RANKL (Tnfs11)	GTACTTTCGAGCGCAGATGG CTGTGTCTTCGCTCTCCAGA	59.08 59.12	125	NM_057149.1
OPG (Tnfrs11b)	ACACACCAACTGCAGCTCAC TGTCCACCAGAACACTCAGC	61.10 59.89	191	NM_012870.2
TRAP (Acp5)	CGGGAGAGATTGGTGTATGGA TGTACAGTGAGCCAGGAGTG	58.88 59.03	81	NM_001270889.1

Legenda: Gene Sequência 5'-3' Tm* Bp Referência FASTA PUBMED GAPDH(Gapdh) F indica um primer forward. R indica um primer reverse. *Par de base (Tamanho do fragmento). *Temperatura de melting do primer.

Fonte elaborada pela autora.

4.10.5.1 Extração de RNA

Para extração de RNA, as amostras do tecido ósseo da região periapical com aproximadamente 0,5 cm³, foram maceradas e pulverizadas através de moagem sob baixa temperatura utilizando cadinho e nitrogênio líquido. A extração de RNA do tecido pulverizado foi realizada utilizando solução de Trizol (Ambion, Inc, AM1926, Waltham, MA, EUA). Posteriormente, a amostra triturada foi coletada com 1 mL do reagente Trizol (AMBION, Inc, AM1926, USA) e com uma pipeta de 1000 µL, lavou-se todo o fundo do cadinho, removendo completamente todo tecido ósseo da superfície. O Trizol (AMBION, Inc, AM1926, USA) é composto por uma solução monofásica contendo fenol, isotiocianato de guanidina e outros componentes que permitiram o isolamento de uma vasta variedade de RNAs. O conteúdo contendo o Trizol e a amostra foi adicionado a um microtubo de 2,0 mL, e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos. Após este procedimento, 200 µL de Clorofórmio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram adicionados e novamente incubado à temperatura ambiente por mais 3 minutos. Transcorrido o tempo, os tubos contendo as soluções de Trizol e amostra foram centrifugados à 4°C, numa rotação de 12.000 RPM por 15 minutos em uma microcentrífuga refrigerada (EPPENDORF 5430, Alemanha). Nesta etapa ocorreu a separação entre a fase aquosa translúcida e a fase orgânica rosa. Então, a fase aquosa sobrenadante foi, cuidadosamente, transferida para um novo microtubo de 1,5mL, onde

adicionou-se 500µL de Isopropanol puro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para a precipitação do RNA. Posteriormente, o tubo foi submetido a uma centrifugação de 12.000 RPM por 15 minutos, a 4°C, para visualização do sedimento (pellet) de RNA. O sedimento obtido foi lavado com Etanol a 70% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), diluído em água Depec) para remoção completa do isopropanol. Novamente, o tubo foi centrifugado a 12.000 RPM por 15 minutos, a 4°C. Para a eluição, foi utilizado 25 µL da solução RNA Storage buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). . Essa técnica de extração por meio do TRIzol (Ambion, Inc., Carlsbad, CA, USA), foi realizada conforme recomendação do fabricante.

Após a eluição, um microlitro de RNA, de cada uma das amostras, foi utilizado para quantificar a absorbância a 260 (A260) e 280 (A280) nm pelo espectrofotômetro Nanodrop® 2000c UV- Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). A pureza, foi analisada por meio das proporções A260/A280 e A260/A230. Na proporção A260/A280, valores entre 1,8 e 2,0 indicam ausência de contaminação com proteína, já para a proporção A260/A230, valores próximos de 1,7 sugerem RNA livre de contaminantes, como TRIzol e álcool. Para a verificação da integridade do RNA, foi utilizada a técnica de eletroforese, executada em gel de agarose 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com coloração com brometo de etídio (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Foram consideradas íntegras e por sua vez, utilizadas, apenas as amostras que apresentaram bandas bem definidas e ainda, que exibiram a banda referente ao rRNA 28S, com o dobro da intensidade da banda referente ao rRNA 18S.

O RNA total extraído foi tratado com DNase I, Amplification Grade (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para que o DNA contaminante fosse removido, evitando assim, um aumento superestimado da expressão gênica.

4.10.5.2 Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR)

O RNA total após o tratamento com DNase foi transcrito para cDNA utilizando o Kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Para a transcrição reversa foi adicionado em um microtubo de 200 µL os seguintes reagentes: Enzima mix (contendo Rnase Out e Superscript III), Reaction mix (oligo (dT)20 (2,5 µM), random hexamers (2,5 ng/µL), 10 mM MgCl₂ e dNTPs), solução de RNA e água Depec para um volume final de 20 µL. Esta mistura foi incubada em termociclador (Mastercycler-Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com o ciclo de: 10 minutos a 25°C, 50°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos. Transcorrido esse ciclo, os tubos foram colocados no gelo e foi adicionado 1 µL de RNase H e incubados por mais 20 minutos a 37°C. O novo cDNA obtido foi armazenado a -20°C.

4.10.5.3 PCR em Tempo Real (qPCR)

A. Análise da eficiência da reação de PCR em Tempo Real:

A eficiência (E) da amplificação da PCR é a taxa na qual um amplicon, produto pós-PCR, é gerado e seus valores expressos em porcentagem. Se um amplicon dobrar em quantidade durante a fase geométrica da amplificação da PCR, então a reação apresentará 100% de eficiência. Esta deve variar idealmente entre os 90% e 100% ($-3.6 > \text{slope} > -3.1$), podendo ser determinada através de métodos diversos. O mais simples baseia-se na equação.

$$E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$$

O slope de uma curva padrão é comumente utilizado para estimar a eficiência de amplificação de uma reação de PCR em tempo real. A estimativa precisa da eficiência da PCR depende de uma série de fatores tais como os reagentes, concentração de

primers e qualidade e quantidade da amostra (<http://www.lifetechnologies.com>). A curva de dissociação dos primers testados indicará apenas um pico mostrando a sua especificidade. O ideal é obter uma menor concentração de primers que gere uma máxima amplificação. Para validação de cada primer foi feita uma curva padrão afim de calcular a sua eficiência de amplificação.

B. Análise da eficiência da reação de PCR em Tempo Real

Os cDNAs transcritos foram amplificados para a quantificação relativa da expressão dos genes *Tnfsf11* (RANKL), *Tnfrsf11b* (OPG), *Acp5* (TRAP). A expressão genética é apresentada como o ratio da concentração dos genes alvos, descritos acima, em relação à concentração do gene de referência (*Gapdh*) e representam a expressão média obtida de reações distintas de PCR em Tempo Real.

O Ct (Threshold Cycle) é o ponto correspondente ao número de ciclos a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do gene alvo avaliado. As médias dos valores de Ct, medidas em duplicata, foram utilizadas para calcular a expressão dos genes alvos, com normalização a um controle interno (*Gapdh*). Os resultados foram obtidos como valores relativos da expressão gênica com base na fórmula comparação a um alvo-interno de referência, previamente selecionado, e que resultou em valor igual 1.

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

O método qPCR avaliou a quantidade do produto cDNA na fase exponencial da reação de amplificação. Para o sistema de detecção, foi utilizado o fluoróforo SYBR® Green (Kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG – Invitrogen, EUA) que constituiu na seguinte reação: em um microtubo de 200 µL, foi colocado 12,5 µL de Super mix Platinum SYBR Green, 1 µL de ROX (corante de referência), 300nM de primer forward, 300 nM de primer reverse, 3,4 µL solução de cDNA (diluída 1:5) e 2,1 µL água Depec (Invitrogen, EUA) para o volume final de 20 µL. Os microtubos foram incubados no aparelho StepOnePlus™ System (Applied Biosystem, EUA) com os seguintes ciclos: 50 °C por 2 minutos, seguido de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos e mais

40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos. Após o término do último ciclo, as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação (Melt), conferindo-se a ausência de qualquer curva bimodal ou sinal anormal de amplificação, analisadas a cada 0,1°C.

A detecção da fluorescência, no fim da etapa de cada ciclo da PCR, permitiu a monitoração da quantidade crescente de cDNA amplificado, sendo os dados obtidos analisados no Software do equipamento de real-time.

4.11 Análises da parte 2

4.11.1 Análises microbiológicas por cultura

Para todas as coletas, a carga microbiológica foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de micro-organismos presentes no canal radicular. Os microtubos com as coletas foram agitados por 60 seg. até a dessorção do conteúdo para facilitar a dispersão dos microrganismos. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas transferindo 100 µL da amostra matriz para a diluição 10^{-1} e assim consecutivamente até a diluição 10^{-3} em microtubos (1,5 mL) contendo 900 µL de Caldo Infuso Cérebro Coração (BHI) (Brain Heart Infusion Broth – HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Mubai, Índia). Em seguida, foram semeados 50 µL da amostra matriz (sem diluição) e 50 µL da diluição 10^{-3} em placas de Petri (Interlab – São Paulo, SP, Brasil) contendo diferentes meios de cultura: 1) Brain Heart Infusion (BHI- ágar Infuso Cérebro Coração- KASVI) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado suplementados com hemina (5 mg/L) e vitamina K1 (1 mg/L), para permitir o crescimento de microrganismos anaeróbios facultativos e/ou aeróbios; 2) Fastidious Anaerobe Agar (FAA- Neogen Corporation, Michigan, USA), acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado suplementados com hemina (5 mg/L) e vitamina K1 (1 mg/L), para permitir a detecção de micro-organismos anaeróbios; 3) ágar Dextrose Sabouraud, acrescido de clorafenicol, para permitir o crescimento de leveduras; 4) ágar Enterococcosel (ECC), meio seletivo para espécies de enterococos 5) ágar Mitis Salivarius, meio seletivo para streptococos; 5) ágar MacConkey, meio seletivo para

detecção de enterobactérias e 7) ágar Manitol Salgado, meio seletivo para estafilococos. As placas contendo FAAf foram incubadas em jarra de anaerobiose a 37°C por 14 dias, e as demais placas foram incubadas em estufa a 37° por 48 horas para permitir o crescimento de micro-organismos. O número de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi determinado a partir da contagem do número de colônias nas placas analisadas levando em consideração a diluição das amostras para obtenção do cálculo final de UFCs.

4.12 Análises estatísticas

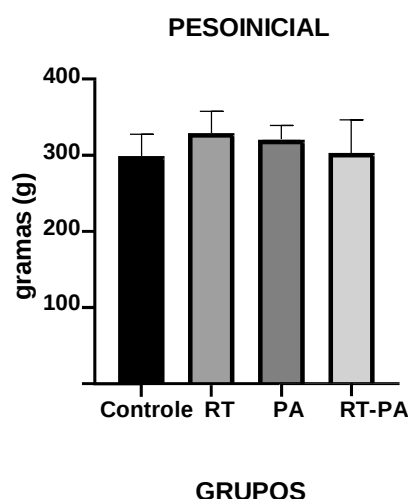
Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para escolha dos testes estatísticos. Os seguintes testes estatísticos foram aplicados em situação de normalidade dos dados: ANOVA e Tukey para os dados paramétricos e Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para os dados não paramétricos. Os valores foram apresentados como média e desvio padrão (dados contínuos) e frequência e porcentagem (dado ordinal). O programa estatístico utilizado foi o programa GraphPad Prism (versão 3.1, da GraphPad Software, USA), com o nível de significância estatística estabelecido em 5% ($P < 0,05$) para todos os dados avaliados.

5.1 Resultados da parte 1

5.1.1 Ganho de peso

Verificou-se que no dia 1, o peso corporal dos animais de todos os grupos foi semelhante com valor médio: Controle 299,3g $\pm$ 28,62; RT 329,6g $\pm$ 28,53; PA 321,5g $\pm$ 18,05 e RT-PA 302,8 $\pm$ 44,18 e sem diferença estatística entre os grupos (Figura 10).

Figura 10 - Representação gráfica do peso corporal médio inicial dos grupos CONTROLE, RT, PA e RT-PA



Fonte: Elaborada pela autora.

Verificou-se que no dia da eutanásia (dia 28), o peso médio dos animais dos grupos: Controle, RT, PA e RT-PA foi diferente. (tabela 1). Verificou-se diferenças estatísticas entre os grupos: Controle e RT ($p=0,0245$) ($p<0,05$); Controle e RT-PA ($p<0,0001$) ($p<0,05$); RT e PA ($p=0,0001$) ($p<0,05$); RT e RT-PA ($p=0,0003$) ($p<0,05$); PA e RT-PA ($p<0,0001$) ($p<0,05$), sendo o peso significativamente menor no grupo radioterapia associada a periodontite apical. Não houve diferença estatística significativa

no peso final entre o grupo Controle e PA.

Tabela 1 - Peso dos animais dos grupos avaliados após 28 dias do experimento

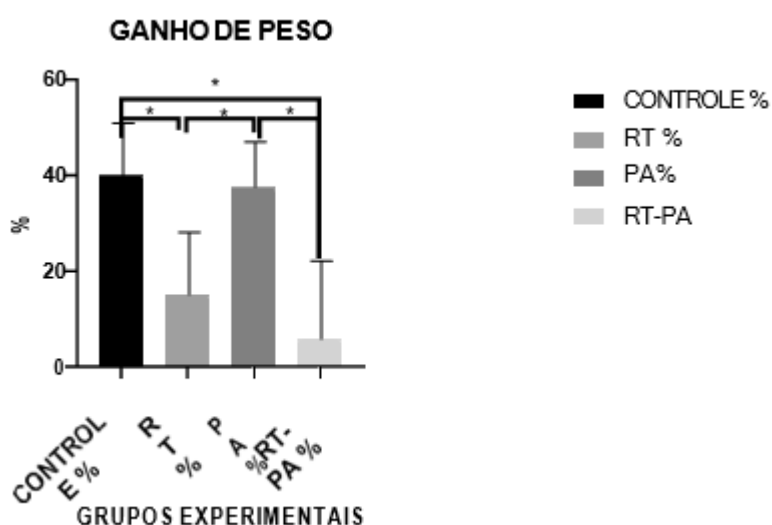
		Controle	RT	PA	RT-PA
PESO	Média	408,3 A	369,5 B	434,6 A	306,7 C
FINAL(g)	±DP	±29,80	±28,40	±22,29	±18,58

Legenda: Média e Desvio Padrão (DP) onde $P < 0,05$. Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas

Fonte: Elaborada pela autora.

Desde o início (dia 1) até o final do experimento (dia 28), foi visto que todos os animais ganharam peso. Entretanto, a porcentagem média de ganho foi distinta entre os grupos: CONTROLE: $40,11\% \pm 11,10\%$; RT: $15,25\% \pm 13,19\%$; PA: $37,8\% \pm 9,543\%$ e RT-PA: $6\% \pm 16,45\%$, (Figura 11), indicando que os grupos submetidos a RT apresentaram um menor ganho de peso, sobretudo quando a RT foi associada à periodontite apical.

Figura 11 - Representação gráfica da porcentagem do ganho de peso dos animais



Legenda: (*) representa diferença estatística.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.2 Teste de campo aberto (open field)

Verificou-se que no dia da eutanásia (dia 28), a movimentação média dos animais no “open field” foi diferente entre os grupos (tabela 2).

Tabela 2- Valores médios e desvio padrão da movimentação dos animais após teste do campo aberto no 28º dia

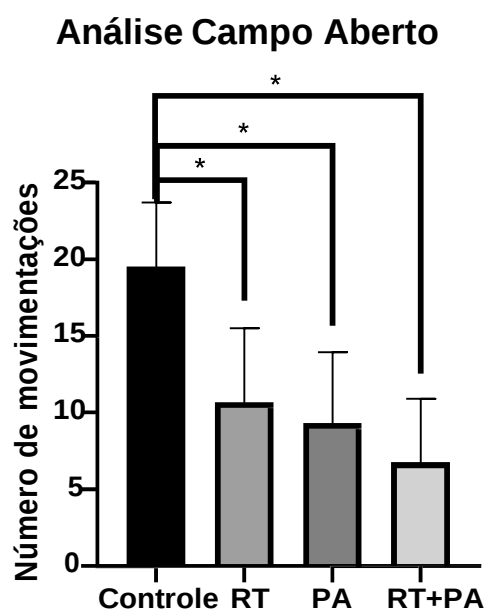
		Controle	RT	PA	RT-PA
Nº	Média	19,56 A	10,67B	9,300B	6,750B
Movimentação o média	±DP	±4,246	±4,950	±4,762	±4,268

Legenda: Média e Desvio Padrão (DP) onde $P < 0,05$. Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas

Fonte: Elaborada pela autora.

Foram verificadas diferenças estatísticas quanto a movimentação entre o grupo controle e os demais grupos experimentais: Controle e RT($p=0,0014$) ($p<0,05$); Controle e PA($p=0,0002$) ($p<0,05$); Controle e RT-PA($p<0,0001$) ($p<0,05$); E não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ($p>0,05$) (Figura 12).

Figura 12- Representação gráfica da avaliação de campo aberto final dos grupos Controle, RT, PA, RT-PA



Legenda: (*) representa diferença estatística.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao comparar movimentação inicial versus final, verificou-se diferença na média da movimentação dos animais que passaram pela radioterapia no decorrer do experimento. No primeiro dia do experimento (antes da radioterapia) a movimentação média era maior. E no final do experimento (28º dia) após radioterapia, a movimentação média foi menor (Tabela 3).

Tabela 3- Movimentação média e desvio padrão dos animais dos grupos RT e RT- PA durante o experimento após teste de campo aberto

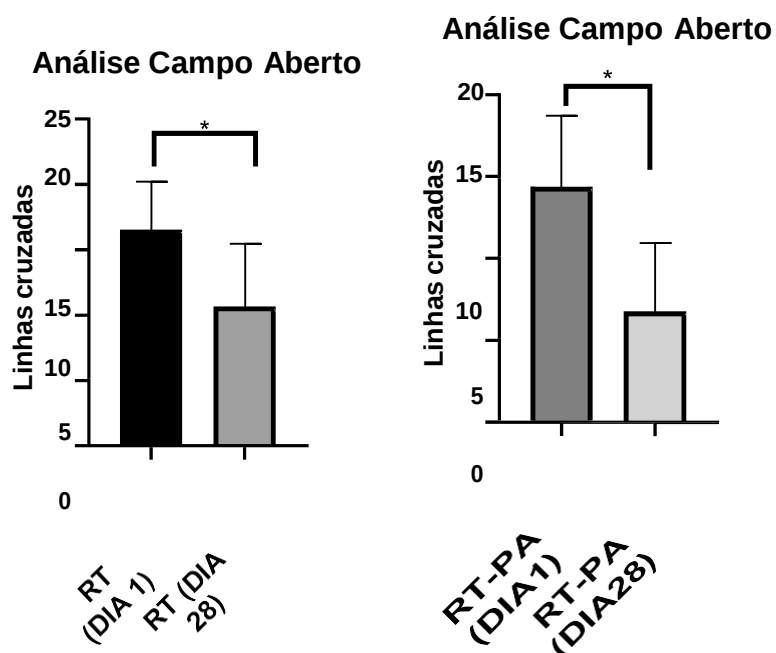
		RT (DIA1)	RT (DIA28)	RT-PA (DIA1)	RT-PA (DIA28)
Nº	Média	16,56A	10,67B	14,38 A	6,750B
Movimentação média	±DP	±3,812	±4,950	±4,438	±4,268

Legenda: Média e Desvio Padrão (DP) onde $P < 0,05$. Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao aplicar o teste estatístico, verificou-se que somente nos grupos submetidos a RT, houve redução da movimentação: RT(DIA 1) e RT (DIA 28)($p=0,0374$)($p<0,05$); RT-PA(DIA 1) e RT-PA (DIA 28)($p=0,0081$)($p>0,05$) (Figura 13).

Figura 13- Representação gráfica da redução da movimentação em campo aberto entre o dia 1º e 28º do experimento dos nos grupos RT e RT-PA



Legenda: (*) representa diferença estatística.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.3 Teste em “y”

Verificou-se que no dia da eutanásia no final do experimento (dia 28), a capacidade de exploração média dos animais no teste y maze foi diferente (tabela4).

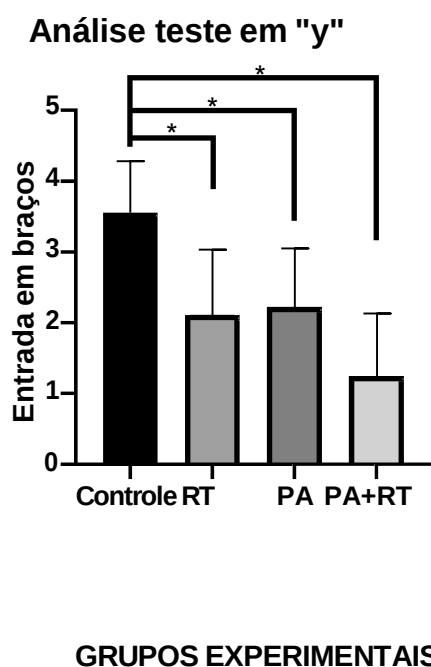
Tabela 4- Valores médios e desvio padrão da capacidade de exploração média dos animais nos grupos RT e RT-PA no final do experimento (dia 28)

		Contr ole	RT	PA	RT- PA
Nº	Mé dia	3,55	2,111	2,22	1,25
Movimen taçã o	±D P	6A 265	B 80	2B 333	0B 864
média					

Legenda: Média e Desvio Padrão (DP) onde *Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).
Fonte: Elaborada pela autora.

Foram verificadas diferenças estatísticas quanto a capacidade de explorar apenas entre o controle e os demais (Figura 14).

Figura 14 - Representação gráfica da avaliação pelo teste em “y” final dos grupos Controle, RT, PA, RT+PA



Legenda: (*) representa diferença estatística.
Fonte: Elaborada pela autora.

Verificou-se que redução na capacidade média exploração dos animais que passaram pela radioterapia no decorrer do experimento (tabela 5). No primeiro diado experimento (antes da radioterapia) a movimentação média foi maior e no final do experimento (28º dia) após radioterapia, a movimentação média foi menor.

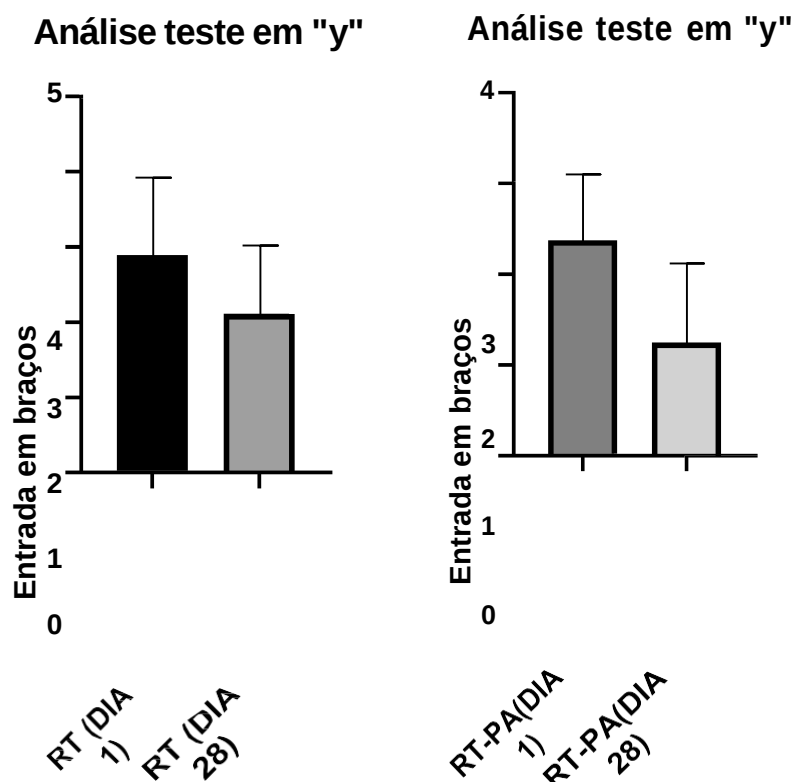
Tabela 5 - Capacidade de exploração dos animais dos grupos RT e RT-PA durante o experimento após teste em Y

		RT (Dia 1)	RT (Dia 28)	RT-PA (Dia 1)	RT-PA (Dia 28)
Nº	Média	16,56A	10,67B	14,38A	6,750B
Movimentação o média	±DP	±3,812	±4,950	±4,438	±4,268

Legenda: Média e Desvio Padrão (DP) onde *Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$).
Fonte: Elaborada pela autora.

Não foram verificadas diferenças estatísticas na capacidade de exploração entre o 1º e 28º dias do experimento nos grupos RT e RT-PA (Figura 15).

Figura 15 - Representação gráfica da capacidade de exploração pelo teste em “y” entre o 1º e 28º dia do experimento nos animais dos grupos RT e RT-PA



Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.4 Análise radiográfica (mm²)

Foram verificadas diferenças estatísticas quanto a área média do espaço do ligamento periapical e lesão periapical entre os grupos: Controle e PA ($p < 0,0001$) ($p < 0,05$); Controle e RT-PA ($p < 0,0001$) ($p < 0,05$); RT e PA ($p < 0,0001$) ($p < 0,05$); RT e RT-PA ($p < 0,0001$) ($p < 0,05$); PA e RT-PA ($p = 0,0032$) ($p < 0,05$) (Tabela 6). A área média da lesão periapical foi maior nos grupos PA e PA-RT, sendo que o grupo PA-RT apresentou maior área de lesão ($p < 0,05$) (Figura 16).

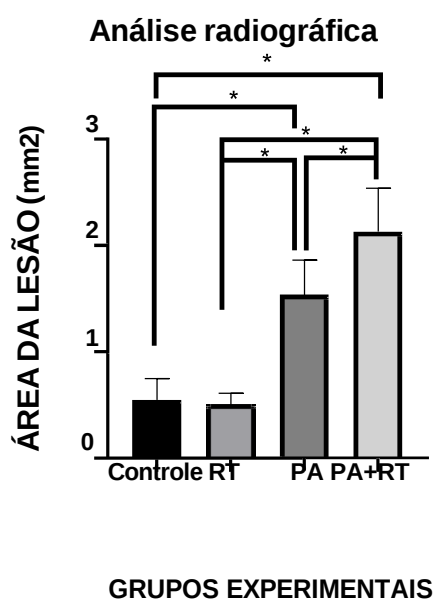
Tabela 6 - Área da lesão periapical radiográfica em todos os grupos estudados

		Controle	RT	PA	RT-PA
Área da PA	Média	0,5481 A	0,4984 A	1,530B	2,331C
(mm²)	±DP	± 0,200	±0,1139	±0,3316	±0,4062

Legenda: Média e Desvio Padrão (DP) onde *Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas(P < 0,05).

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 16- Representação gráfica da área do espaço do ligamento periapical e lesão periapical média referente a avaliação radiográfica dos grupos Controle, RT, PA e RT- PA

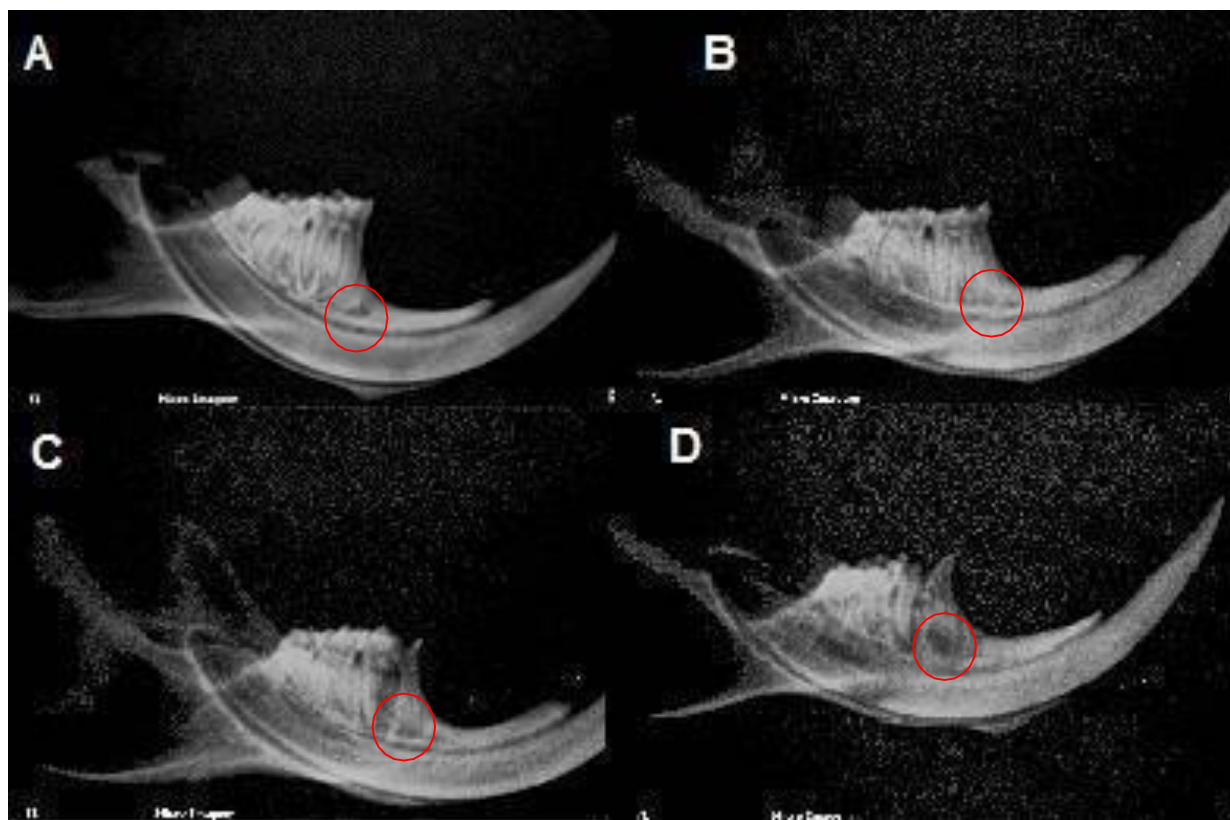


Legenda:(*) representa diferença estatística.

Fonte: Elaborada pela autora.

Verificou-se que a destruição óssea periapical foi mais extensa no grupo RT-PA, invadindo a região de furca (figura 17).

Figura 17- Imagens radiográficas representativas do espaço do ligamento periapical e lesão periapical do primeiro molar inferior de ratos, de acordo com os grupos avaliados



Legenda: A)Grupo controle; B) Grupo RT; C) Grupo PA; D) Grupo RT-PA.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.5 Análise por microtomografia computadorizada

Na análise microtomográfica verificou-se que a radioterapia associada a periodontite apical causou maior destruição óssea periapical no terço apical da raiz mesial dos primeiros molares. Na tabela 7 estão representadas as médias de volume da periodontite apical em todos os grupos avaliados.

Tabela 7 - Valores do volume de lesão periapical (média e desvio-padrão) obtidos pela análise microtomográfica

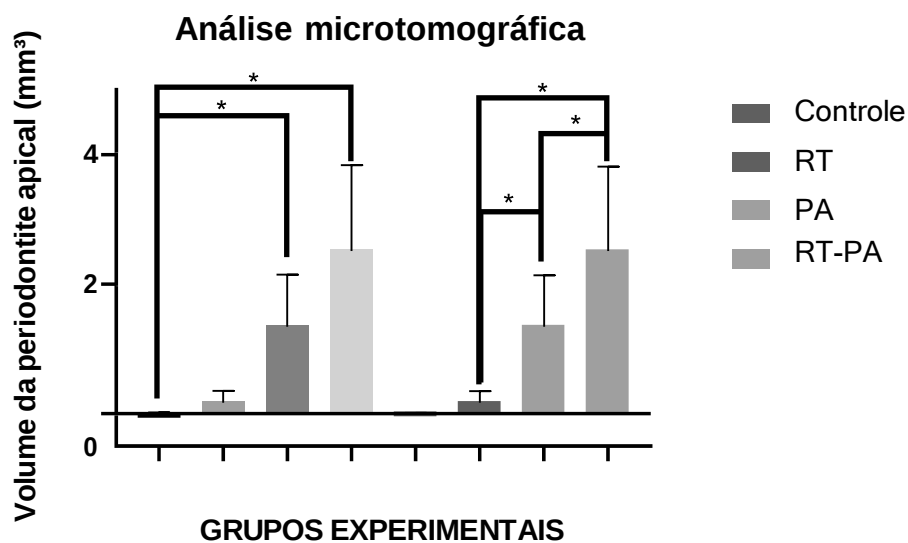
Grupos	Volume da Lesão(mm³) ± DP
Controle	0,02021± 0,01155 A
RT	0,1832± 0,1842 A
PA	1,357± 0,8108 B
RT-PA	2,527± 1,326 C

Legenda: Média e Desvio Padrão (DP) onde letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas, $P < 0,05$.

Fonte: Elaborada pela autora.

Verificou-se diferenças estatísticas quanto ao volume do espaço do ligamento periapical e lesão periapical entre os grupos: controle e PA ($p=0,037$) ($p<0,05$); Controle e RT-PA ($p<0,0001$) ($p<0,05$); RT e PA ($p=0,0119$) ($p<0,05$); RT e RT-PA ($p<0,0001$) ($p<0,05$); PA e RT-PA ($p=0,0257$) ($p<0,05$);. A figura 18 ilustra graficamente os valores correspondentes ao do espaço do ligamento periapical e lesões periapicais nos diferentes grupos.

Figura 18 – Representação gráfica da avaliação microtomográfica dos volumes de lesões periapicais nos grupos Controle, RT, PA, RT-PA

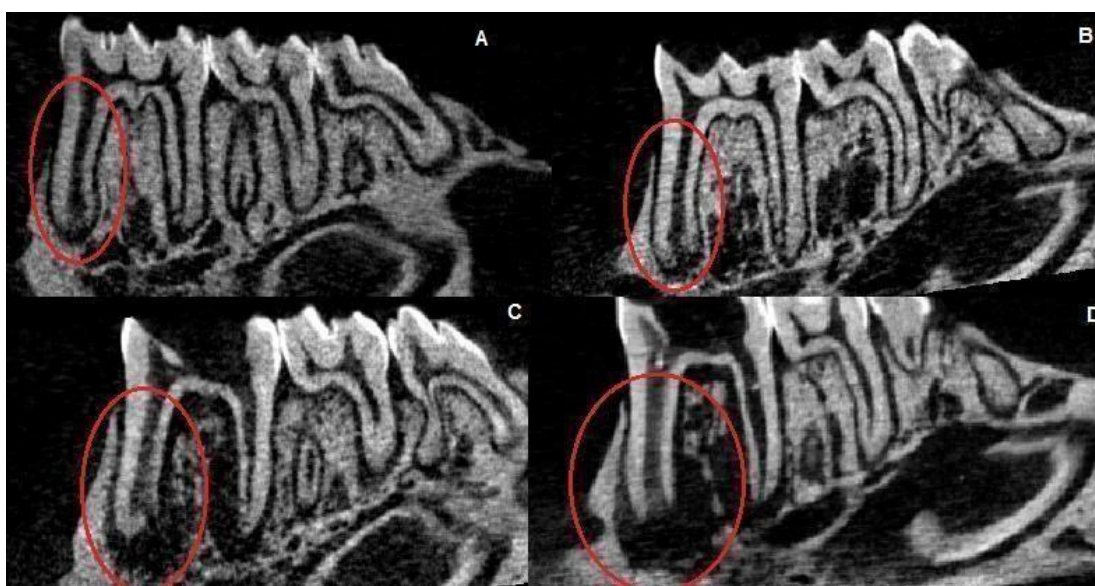


Legenda:(*) representa diferença estatística.

Fonte: Elaborada pela autora.

Verificou-se destruição óssea periapical extensa nos grupos com indução de periodontite apical, principalmente quando associada à radioterapia, invadindo a região de furca no grupo RT-PA, atingindo grandes proporções. A Figura 19 ilustra a região da destruição óssea periapical nos diferentes grupos de estudo.

Figura 19 - Representação 2D da destruição óssea periapical pela análise microtomográfica de todos os grupos de estudo. A marcação em vermelho representa a região do terço apical da raiz mesial dos primeiros molares, que foi utilizada para quantificação do volume da lesão periapical



Legenda: A)Grupo Controle; B) Grupo RT; C) Grupo PA; D)Grupo RT-PA.

Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.6 Análise Histológica

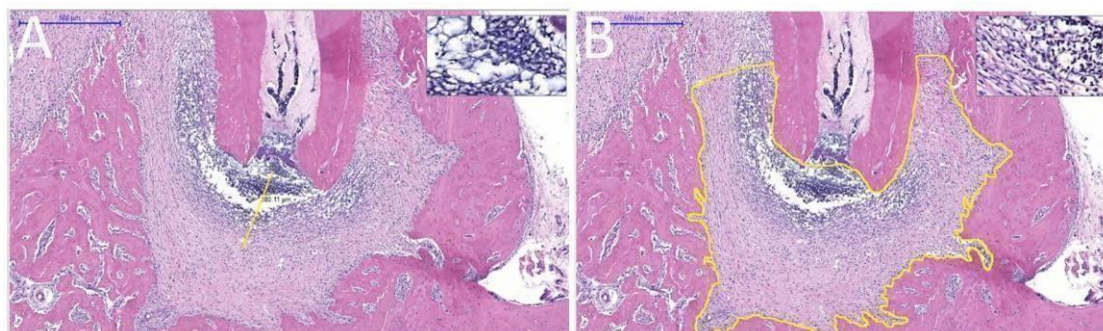
A extensão do infiltrado inflamatório foi mensurada traçando uma linha reta partir do ápice radicular e se estendendo até o limite do infiltrado como demonstrado (Figura 20A). Para a quantificação da reabsorção óssea associada ao terço apical da raiz distal do primeiro molar a área da lesão periapical foi calculada através do delineamento manual do limite da lesão (Figura 20B)

Verificou-se evidências de inflamação nos grupos PA e RT-PA, em todo perímetro da região periapical, havendo sinais de reabsorção óssea ativa. Histologicamente, o grupo RT-PA apresentou maiores escores de intensidade e extensão de infiltrado inflamatório, embora apresentando área de perda óssea semelhante ao grupo PA. Em relação à área de reabsorção óssea os grupos

Controle e RT apresentaram valores de área de lesão periapical significativamente menores ($p < 0,05$) comparadas aos grupos PA e RT-PA (Figura 21).

Em relação à intensidade do infiltrado inflamatório, diferenças estatísticas significantes foram observadas em todos os grupos, exceto entre o grupo Controle e RT (score mediano: 1) ($p < 0,05$). Em relação à extensão do infiltrado inflamatório, foi observada diferença estatística significativa entre todos grupos: Controle, RT, PA e RT-PA (score mediano: 1,2,3,4 respectivamente) ($p < 0,05$) (Tabela 8). Figura 20 - Imagens representativas da análise histomorfométrica da lesão periapical

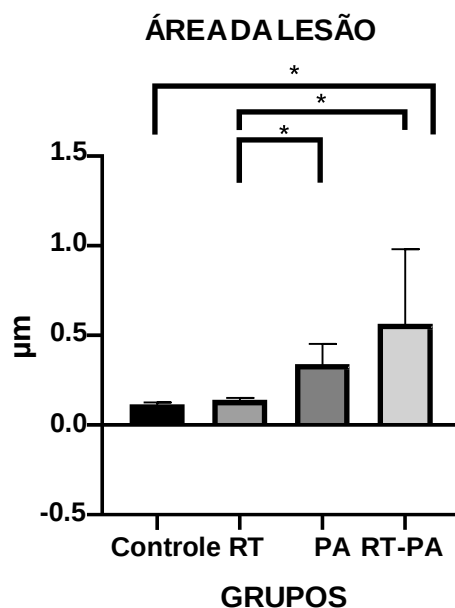
Figura 20 - Imagens representativas da análise histomorfométrica da lesão periapical



Legenda: a) traçado para mensuração da extensão do infiltrado inflamatório; b) delineamento manual da área de reabsorção óssea a partir do terço apical.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 21 – Representação gráfica da estatística da análise histológica da área da lesão periapical/ ligamento periapical de todos os grupos



Legenda: (*) representa diferença estatística.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 8 - Scores, Mediana, Média e Desvio padrão (DP) dos achados histológicos, referente a lesão periapical de todos os grupos

Parâmetros Histológicos	Scores -	Grupos Ex			
		Controle			RT-PA
Intensidade do Infiltrado Inflamatório	1	6/7	4/7	0/7	0/7
	2	0/7	3/7	0/7	0/7
	3	0/7	0/7	5/7	1/7
	4	0/7	0/7	2/7	6/7
	Mediana	1a	1a	3b	4c
Extensão do infiltrado	1	4/7	2/7	0/7	0/7
	3	3/7	5/7	1/7	0/7
	4	0/7	0/7	2/7	2/7
	4	0/7	0/7	4/7	5/7
Área da Lesão Periapical (mm²)	Mediana	1a	2b	3c	4d
	Média	0,1160±	0,1403 ±	0,3402 ±	0,5662 ±
	±DP	0,01956a	0,02121a	0,02121b	0,4230b

Legenda: *Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas, P < 0,05.

Fonte: Elaborada pela autora.

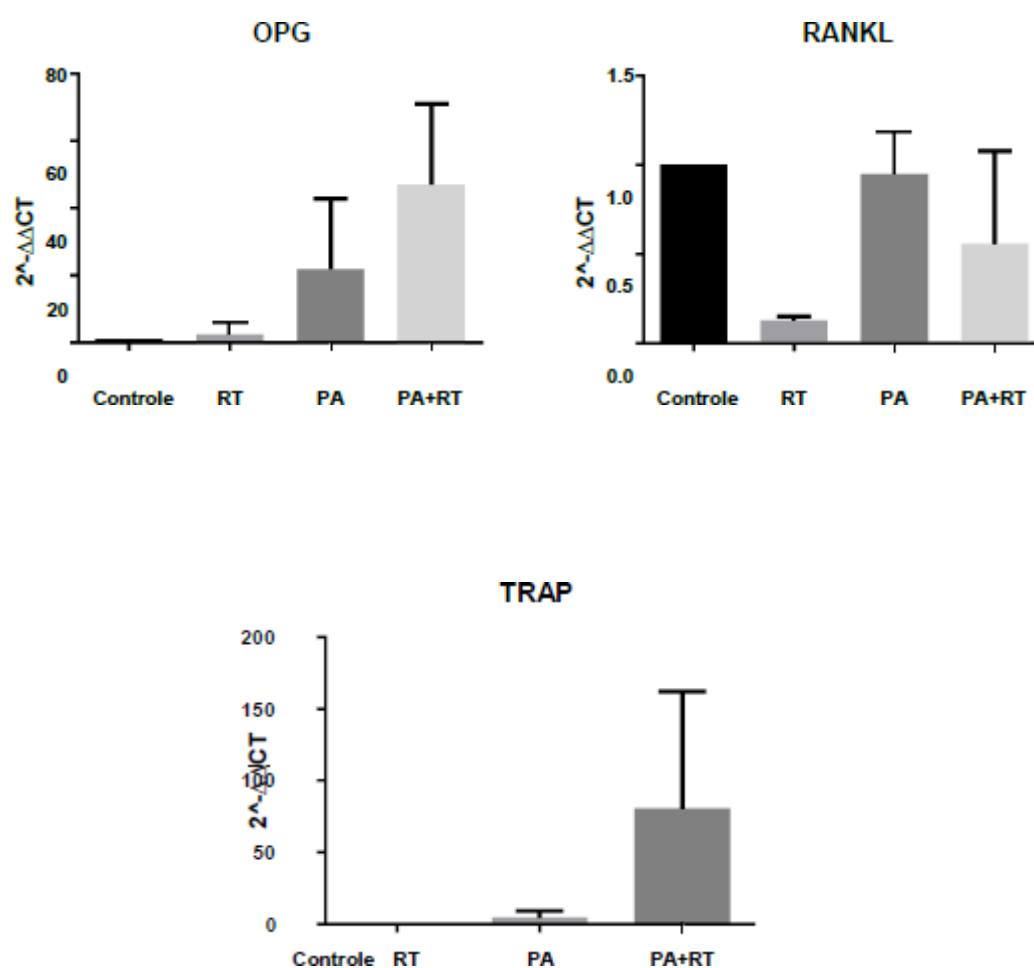
5.1.7 Avaliação da expressão gênica de biomarcadores da reabsorção óssea por RT-PCR

Amostras ósseas da região periapical dos molares superiores direitos dos animais foram obtidas e armazenadas em solução de RNA later até o momento de sua utilização. Os resultados da quantificação relativa representam a variação no nível de expressão dos genes alvos. Todas as reações foram feitas em duplicata. Os resultados foram obtidos como valores relativos da expressão gênica (com base na fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$) em comparação a um alvo-interno de referência, previamente selecionado, e que resulta em valor 1.

A expressão relativa dos genes alvos RANKL, OPG e TRAP está demonstrada na Figura 22. Verificou-se que a expressão gênica de OPG foi significativamente mais alta no grupo PA e RT-PA em relação aos outros grupos ($p > 0,05$). Não houve diferença estatística em relação a expressão gênica de RANKL entre os grupos.

A expressão gênica TRAP foi significativamente mais alta no grupo PA em relação ao grupo Controle ($p = 0,0153$) e RT ($p = 0,0200$). O grupo RT-PA foi o único grupo experimental a apresentar uma supressão da expressão gênica de TRAP.

Figura 22 - Expressão gênica de RANKL OPG e TRAP nos grupos



Fonte: Elaborada pela autora.

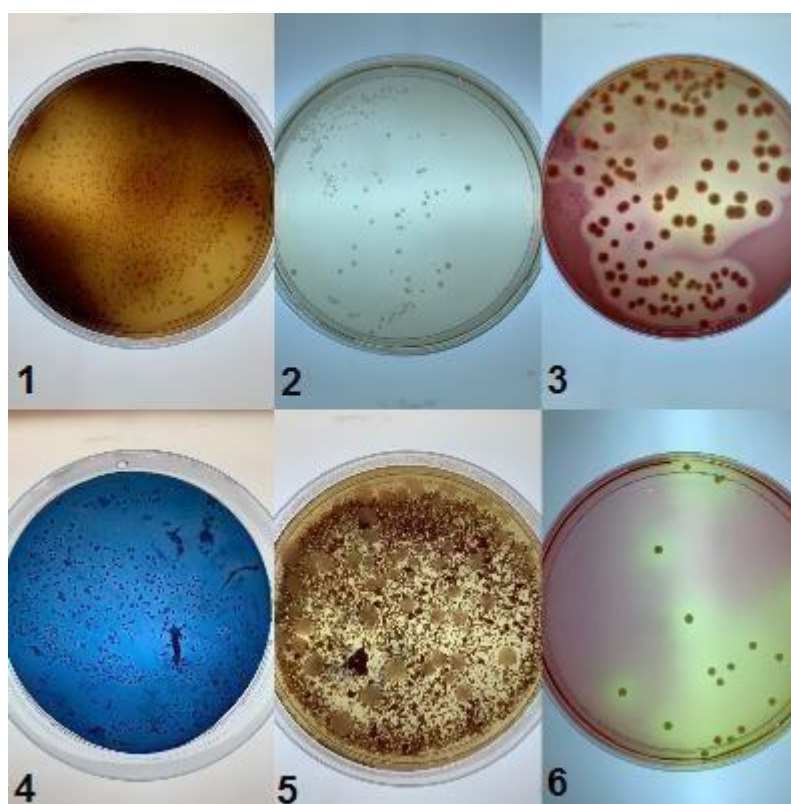
5.2 Resultados da parte 2

5.2.1 Análise microbiológica (UFC/mL)

Conforme mostra a figura 23, após abertura coronária houve crescimento de microrganismos presentes no canal radicular nas placas Petri contendo os meios seletivos para cada espécie. Em 100% das amostras iniciais (S1) nos meios: ágar

Enterococcosel (ECC); Ágar Mitis Salivarius; Brain Heart Infusion (BHI); Fastidious Anaerobe Agar (FAA) microrganismos cultiváveis foram detectados com valores médios, mediana e desvio padrão (tabela 9). Todos os grupos apresentaram redução de bactérias cultiváveis em S2, quando comparou-se a coleta após abertura coronária (S1) e após preparo dos canais (S2).

Figura 23- Crescimento de microrganismos presentes no canal radicular nas placas Petri contendo os meios seletivos para cada gênero



Legenda: 1) Ágar Enterococcosel; 2) Ágar Dextrose Sabouraud, acrescido de clorafenicol; 3) Ágar MacConkey; 4) Ágar Mitis Salivarius 5) Brain Heart Infusion (BHI) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado suplementados com hemina (5 mg/L) e vitamina K1 (1 mg/L); 6) Ágar Manitol Salgado.
Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 9- Mediana, média e desvio padrão dos valores (UFC/ml) encontrados para o crescimento de microrganismos cultivados nos diferentes meios de cultura, obtidos após abertura coronária e após preparo biomecânico dos canais

Meio	Microrganismos		GRUPOS			
			RT		SEM RT	
			Após abertura (S1)	Após PBM (S2)	Após abertura (S1)	Após PBM (S2)
BHI	<u>Anaeróbios facultativos e/ou aeróbios</u>	Média	482,1 A	0,5714 B	132,7 A	0,000 B
		Mediana	576,0	0,000	75,00	0,00
		± SD	319,9	0,9759	149,8	0,000
ECC	<u>Enterococos</u>	Média	1255143 A	2857 B	1434000 A	28667 B
		Mediana	952000	0,000	951000	0,00
		± SD	1520857	7559	1419930	70219
MITIS SALIVARIUS	<u>Streptococos</u>	Média	760000 A	3143 B	146667 A	1000 B
		Mediana	924000	0,000	111000	0,000
		± SD	699399	7471	117825	1673
FAA	<u>Anaeróbios</u>	Média	810,4 A	38,57 B	576,2 A	218,8 B
		Mediana	356,0	1,000	257,0	26,00
		± SD	919,2	69,77	615,9	437,1
MANITO L SALGADO	<u>Estafilococos</u>	Média	3,714 A	0,000 A	5,000 A	0,000 A
		Mediana	0,000	0,000	0,000	0,000
		± SD	7,718	0,000	11,18	0,000
SABOURAUD DEXTROSE	<u>Leveduras</u>	Média	23,43 A	0,000 B	3,833 A	0,000 A
		Mediana	0,000	0,000	0,000	0,000
		± SD	61,11	0,000	9,390	0,000
MCCONKEY	<u>Enterobactérias</u>	Média	0,1667 A	0,000 A	0,6000 A	0,000 A
		Mediana	0,000	0,000	0,000	0,000
		± SD	0,4082	0,000	1,342	0,000

Legenda: *Letras maiúsculas indicam diferença entre as colunas (intergrupos).

Fonte elaborada pela autora.

6 DISCUSSÃO

Os estudos clínicos e em modelos animais tem ganhado destaque na comunidade científica endodôntica, no contexto de analisar as condições patológicas sistêmicas que podem favorecer a progressão e desenvolvimento de doenças periapicais. Pesquisas mostram que existe uma inter-relação entre alterações desencadeadas pelo estresse crônico e a progressão e desenvolvimento de doenças de origem endodôntica (Gomes et al., 2019; Khoury et al., 2020; Minhoto et al., 2021). Portanto, é possível destacar uma relação bidirecional entre algumas condições sistêmicas que podem potencializar a patogênese da infecção endodôntica, favorecendo seu desenvolvimento e progressão (Cintra et al., 2021; Dash et al., 2022; Niazi e Bakhsh et al., 2022; Nagendrababu et al., 2020)

A radioterapia é conhecida por ser uma modalidade de tratamento comum nos pacientes com câncer de cabeça e pescoço, que pode desencadear diversas alterações no sistema imunológico dos pacientes tratados. Seu impacto na cavidade oral já é bem estabelecido. Existem diversos estudos que avaliaram os efeitos da radioterapia em modelos animais (Yamasaki et al., 2020; Araujo et al., 2018; Kim et al., 2017; Özgür et al., 2019; Özer et al., 2016). Porém são poucos estudos que relacionam a RT ao desenvolvimento de doenças periapicais e eles apresentam contradições e incoerências (Hommeiz et al., 2008, 2013; Ribeiro et al., 2012). Por isso, esse estudo teve o objetivo de avaliar o efeito da RT sobre a patogênese da PA, além de avaliar o perfil microbiológico intracanal usando modelo animal.

6.1 Discussão da parte 1

As alterações no peso dos animais foi utilizada como um parâmetro dos efeitos sistêmicos da RT. A radioterapia desencadeia mucosites, xerostomia, levando a uma diminuição na ingestão de alimentos a partir da dificuldade de realizar efetivamente a mastigação e deglutição (Strojan et al., 2017; Baudalet et al., 2019; Beech et al., 2014) mesmo utilizando dieta líquida e pastosa. Nesse estudo, verificou-se que o peso

inicial dos animais foi semelhante mostrando que a amostra foi semelhante para todos os grupos. Entretanto, no último dia do experimento (dia 28) que os animais submetidos a RT apresentaram menor ganho de peso do que os animais do grupo Controle e PA. Este resultado corrobora com outros estudos na literatura que descrevem a redução de peso como um dos efeitos colaterais comumente associados a RT. (Ottosson et al., 2012; Lee et al., 2019).

Outro parâmetro utilizado foi a análise comportamental através da movimentação dos animais pelo teste do campo aberto (open field); e da capacidade de exploração média dos animais no teste y maze. Quando comparou-se a movimentação inicial versus final dos animais que passaram pela radioterapia, verificou-se uma diminuição na movimentação entre o primeiro dia do experimento (antes da RT) e o último dia do experimento (após RT). Demonstrando que a RT leva a alteração comportamental de diminuição na movimentação. Mas, não é possível comparar os resultados desse estudo com outros da literatura pois até o momento não existem estudos sobre o efeito da RT no comportamento dos animais. Esses achados concordam com Pytel et al. (2003) que verificaram em humanos mudanças significativas no estado psicológico dos pacientes após RT para câncer de cabeça e pescoço. Os autores relacionaram esta depressão a dificuldade fonética, de deglutição, respiração e até mesmo a percepção da própria imagem. Sharp et al. (2023) verificaram a RT levar a depressão, no entanto, verificaram que existem preditores e que a depressão diminui com o tempo. No presente estudo, verificou-se que os animais, mesmo sendo seres irracionais, sentiram-se deprimidos após RT.

A destruição óssea periapical foram monitorados por meio de análise radiográfica e análise microtomográfica. A microtomografia produz uma imagem tridimensional (3D) com detalhes e resolução excepcionalmente altos (Patel et al., 2019). No presente estudo verificou-se que a RT por si só não foi responsável por causar lesão periapical, no entanto, quando a destruição óssea periapical está presente, a RT é capaz de potencializar a reabsorção óssea periapical. Como verificado no presente estudo em que a periodontite apical foi significativamente maior quando associado à RT. Isso pode ser explicado uma vez que o trabeculado ósseo favorece a reabsorção uma vez que a atividade osteoclástica é alterada após RT (Sweeney-Ambros et al., 2022), ocorrendo colapso das células da medula óssea, com consequentes alterações na microcirculação (Zhong et al., 2022) culminando em edema, hipoxia, vacuolização das células endoteliais resultando em perda de osteócitos e diminuição na forma do colágeno, que

é a matriz extracelular dos osteoblastos (Lee et al., 2009).

A radiografia periapical é comumente utilizada na endodontia, mas tem algumas limitações bem estabelecidas na literatura (Leonardi Dutra et al., 2016; Zhang et al., 2016; Lo Giudice et al., 2018). Esse exame, pode não refletir corretamente o tamanho das lesões periapicais e subestimar a destruição óssea. No entanto, nos pacientes pós RT, que apresentam algumas condições de limitação de abertura, trismo e dificuldades para realização de exames, é uma conduta comum a realização de exame radiográfico evitando-se a tomografia. Por isso, nesse estudo, a análise radiográfica teve como objetivo avaliar comparativamente a destruição periapical observada na radiografia com a detectada na microtomografia. E, de forma semelhante aos achados microtomográficos, a análise por RX-periapical revelou maiores volumes de perda óssea periapical no grupo o qual houve associação da radioterapia com a periodontite apical (RT-PA).

Histologicamente, as evidências do processo inflamatório foram observadas apenas nos grupos PA e RT-PA, demonstrando que essa inflamação estava associada a áreas de reabsorção óssea nos grupos que receberam indução de PA. Esses grupos apresentaram lesão periapical composta predominantemente de um infiltrado inflamatório crônico e restritas à região periapical. . Em relação a área de reabsorção óssea os grupos RT-PA e PA, não apresentaram diferenças estatísticas significantes, e ambos apresentaram um processo inflamatório mais intenso e extenso com características granulomatosas. No entanto, os animais expostos a radioterapia associada a periodontite apical tiveram uma PA mais severa comparada ao outro grupo PA apresentando maiores escores de intensidade, bem como de extensão do infiltrado inflamatório. Não houve diferença estatística entre área e intensidade do infiltrado inflamatório entre os grupos Controle e RT, no entanto, a extensão do ligamento periapical foi maior nos grupos submetidos a RT, sugerindo um espessamento do LP. Isso pode ser explicado pois a radiação ionizante é absorvida pelas células causando rompimento em estruturas anatômicas e produzindo alterações químicas e biológicas (Azzam et al., 2012).

Além disso, pode ocorrer a radiólise da água com geração de radicais oxidativos com danos aos ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (Azzam et al., 2012). Assim, ocorrem alterações bioquímicas e na sinalização celular, com consequentes alterações fisiológicas (Spitz et al., 2004). No processo inflamatório crônico, o que ocorre nas lesões periapicais, quando afetado pela RT, macrófagos e neutrófilos que chegam ao local

geram espécies reativas de oxigênio que podem causar danos ao DNA, podendo levar a mutações, bem como morte celular (Redon et al., 2010; Hair et al., 2010; Sedelnikova et al., 2010)

Atualmente a técnica PCR em tempo real (RT-PCR), é considerada ideal para avaliar a expressão gênica, devido a sua alta sensibilidade, rapidez e segurança (Jozefczuk et al., 2011; Wagner, 2013). Por isso, nesse estudo, empregou-se esse método para entender como a RT atua em alguns mecanismos celulares e moleculares que estão envolvidos no desenvolvimento da lesão periapical. A interação, superexpressão ou desequilíbrio de algumas moléculas estão relacionadas a inflamação local e ativação de osteoclastos, culminando em reabsorção de tecidos periapicais mineralizados, além de fibras colágenas e matriz extracelular.

Existe um mecanismo, relacionado a atividade óssea, que é formado pela interação entre o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL), o receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK) e a osteoprotegerina (OPG). Essa via é responsável por controlar o processo de metabolismo ósseo, controlando a formação e reabsorção óssea, sinalizando e regulando a ativação e diferenciação de osteoclastos, bem como de osteoblastos (Yasuda, 2021; Boyce et al., 2008).

Uma razão desequilibrada entre as moléculas RANKL e OPG é crítica para homeostasia das células óssea, já que essa descompensação afeta a comunicação entre osteoblastos e osteoclastos, influenciando na progressão da reabsorção óssea periapical (Carneiro et al., 2017). A OPG protege o osso da reabsorção, a concentração de RANKL e OPG no osso determina força e massa óssea. Uma maior expressão de OPG foi observada nos grupos PA e RT-PA que também apresentaram sinais microtomográficos e histológicos característicos de periodontite apical com severa reabsorção óssea, portanto sua maior expressão pode estar relacionada a uma resposta defensiva do sistema imunológico.

Já a molécula TRAP é vista em processos de degradação e síntese de fibras colágenas e também está envolvida no processo de osteoclastogênese (Hayman, 2008). TRAP é uma enzima considerada como um marcador osteoclástico, por ser secretada na borda ondulada dessa célula, sendo associada à geração de espécies reativas de oxigênio, bem como à reabsorção óssea (Hayman, 2008; Kaunitz, Yamaguchi, 2008). No entanto a expressão de TRAP não é exclusiva de osteoclastos, sendo expressa também por macrófagos, já que ambas as células tem como precursor os mastócitos

(Husch et al., 2021; Hayman et al., 2001). De acordo com Hayman et al. (2001), TRAP⁷¹ é abundantemente expressa em epitélio e por células dendríticas, sugerindo seu envolvimento potencial na resposta imune.

Hayman et al. (2008) verificaram que TRAP possui papel crítico em processos biológicos incluindo síntese e degradação de colágeno, mineralização óssea, além de ser capaz de degradar fosfoproteínas esqueléticas, a ausência da expressão dessa enzima no grupo PA-RT pode estar relacionada a possibilidade da interferência do RT nesse processo de degradação de colágeno e mineralização. No entanto, são necessários mais estudos para compreender melhor esses resultados obtidos nessa pesquisa.

No presente estudo sua maior expressão foi observada no grupo PA. No entanto, esta molécula não foi expressa no grupo RT-PA, podendo assumir que a deficiência dessa molécula pode estar associada a redução na capacidade de síntese de colágeno e reparação tecidual.

Por fim, verificou-se neste estudo que a destruição periapical pode ter sua progressão alterada alcançando maiores magnitudes, quando a doença cárie atinge o tecido pulpar em uma área submetida pela RT. A radioterapia influencia o desenvolvimento da lesão periapical uma vez que diferentes marcadores são afetados durante esse processo e há uma exacerbação do processo inflamatório. De acordo com nossos resultados, estudos futuros são necessários para encontrar estratégias inovadoras que possam regular as vias de sinalização OPG-RANK- RANKL e a molécula TRAP que agem no processo de reabsorção óssea em pacientes submetidos a RT de cabeça e pescoço.

6.2 Discussão da parte 2

Na segunda parte desse trabalho, o objetivo foi conhecer o perfil microbiano das infecções após RT, para isso, existem diferentes métodos que podem ser empregados para identificação e quantificação de microrganismos. Nesse estudo, utilizamos a cultura microbiológica por meio unidades formadoras de colônia (UFC/ml), antes e após o PBM dos canais. O conteúdo coletado no interior dos canais foi armazenado em VMGA III (Ali et al., 1995), seguido da semeadura em placas de petri contendo meios específicos para microrganismos: anaeróbios facultativos e aeróbios; Anaeróbios estritos; Enterococos; Estreptococos; Estafilococos; Leveduras. O propósito desse primeiro estudo, em modelo animal para avaliar a microbiota intracanal foi mostrar se existe diferenças gerais na microbiota de animais irradiados, em relação aos não irradiados, para o desenvolvimento de doenças de origem endodôntica.

É necessária a proliferação de múltiplas comunidades bacterianas para o desenvolvimento das infecções endodônticas primárias (Sundqvist, 1994). Com o conteúdo das coletas realizadas após a abertura coronária (S1), verificou-se a presença de todos os tipos de microrganismos nos animais submetidos ou não à RT, principalmente de Anaeróbios facultativos e/ou aeróbios; Espécies de Enterococos; Streptococos; Anaeróbios. A carga bacteriana foi semelhante, nos 2 grupos (com ou sem RT). No entanto, devido ao número da amostra ser pequeno, não foi observada diferença estatística significativa.

Verificou-se ainda uma redução no número de microrganismos cultiváveis após PBM (S2) utilizando NaOCl 1,0% no protocolo de irrigação convencional com agulha. Demonstrando a efetividade do preparo biomecânico na eliminação de microrganismos (UFC/mL) cultiváveis na infecção endodôntica primária das amostras dos grupos com e sem RT.

As alterações na composição na microbiota do canal radicular após radioterapia nunca foram estudados anteriormente. Com esse estudo inicial podemos ter uma percepção de quais as principais inter-relações entre as espécies.

Embora, nas infecções endodônticas exista uma microbiota composta por fungos e vírus, as bactérias são os microrganismos mais prevalentes em dentes com

necrose pulpar (Siqueira, Rôças, 2022). Machado et al. (2020) verificaram uma microbiota diversificada em infecções endodônticas primárias em pacientes saudáveis. No entanto, pacientes com problemas sistêmicos, podem apresentar alterações na microbiota intracanal, já que podem apresentar alterações na microbiota bucal devido à xerostomia e mucosites. Além disso a radiação ionizante afeta os tecidos por meio de alterações no nível celular pelos efeitos diretos no DNA ou pelos efeitos indiretos na forma de biomoléculas (Singh et al., 2021) podendo assim levar a alterações diretas nas bactérias presentes na área irradiada. Verificou-se no presente estudo diferenças entre a carga bacteriana presentes nos animais com e sem RT, mas o estudo tem um “n” muito pequeno e novos estudos são necessários para verificar os resultados do presente estudo.

7 CONCLUSÃO

- A RT diminuiu a massa corporal e capacidade de movimentação média dos animais, dificultando a qualidade de vida dos mesmos;
- A área e o volume da lesão periapical foi significativamente maior no grupo em que se associou a RT à PA nas análises microtomográficas e radiográficas;
- Houve maior intensidade e extensão do processo inflamatório no grupo RT- PA;
- Biomarcadores como OPG e TRAP relacionados ao metabolismo ósseo se mostraram alterados no grupo com indução da PA e RT-PA, influenciando no desenvolvimento da lesão periapical;
- A radioterapia influenciou negativamente a patogênese da PA induzida;
- A carga bacteriana é especialmente composta por microrganismos anaeróbios facultativos, aeróbios, estreptococos e anaeróbios quando há periodontite apical, associada ou não a RT de cabeça e pescoço;
- O preparo biomecânico foi eficiente na redução do número de microrganismos anaeróbios facultativos e/ou aeróbios; anaeróbios; leveduras; espécies de enterococos; streptococos; Enterobactérias e estafilococos do canal radicular;

REFERÊNCIAS

Abdel-Magied N, Shedid SM, Ahmed AG. Mitigating effect of biotin against irradiation-induced cerebral cortical and hippocampal damage in the rat brain tissue. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019 May;26(13):13441-52. doi: 10.1007/s11356-019-04806-x. Epub 2019 Mar 25. PMID: 30911963.

Abedi SM, Yarmand F, Motallebnejad M, Seyedmajidi M, Moslemi D, Bijani A, et al. Radioprotective effect of thymol against salivary glands dysfunction induced by ionizing radiation in rats. *Iran J Pharm Res*. 2016 Fall;15(4):861-6. PMID: 28243283; PMCID: PMC5316265.

Akyuz M, Taysi S, Baysal E, Demir E, Alkis H, Akan M, et al. Radioprotective effect of thymoquinone on salivary gland of rats exposed to total cranial irradiation. *Head Neck*. 2017 Oct;39(10):2027-35. doi: 10.1002/hed.24861. Epub 2017 Jul 14. PMID: 28708300.

Ali RW, Bancescu G, Nielsen O, Skaug N. Viability of four putative periodontal pathogens and enteric rods in the anaerobic transport medium VMGA III. *Oral Microbiol Immunol*. 1995 Dec;10(6):365-71. doi: 10.1111/j.1399-302x.1995.tb00168.x. PMID: 8602345.

Almståhl A, Wikström M, Fagerberg-Mohlin B. Microflora in oral ecosystems and salivary secretion rates--A 3-year follow-up after radiation therapy to the head and neck region. *Arch Oral Biol*. 2015 Sep;60(9):1187-95. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.04.004. Epub 2015 May 22. PMID: 26058004.

American Cancer society- ACS [internet]. Risk factors and causes of childhood cancer. Atlanta. [Cited 22 feb 2022]. Atlanta: American Cancer Society. Available at: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-in-children/risk-factors-and-causes.html>.

Araujo MVT, Spadella MA, Chies AB, Arruda GV, Santos TDM, Cavariani MM, et al. Effect of low radiation dose on the expression and location of aquaporins in rat submandibular gland. *Tissue Cell*. 2018 Aug;53:104-110. doi: 10.1016/j.tice.2018.06.006. Epub 2018 Jul 6. PMID: 30060820.

Arıcıgil M, Dündar MA, Yücel A, Arbağ H, Arslan A, Aktan M, et al. Anti-inflammatory effects of hyperbaric oxygen on irradiated laryngeal tissues. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2018 Mar-Apr;84(2):206-11. doi: 10.1016/j.bjorl.2017.02.001. Epub 2017 Feb 27. PMID: 28341337; PMCID: PMC9449171.

Azzam EI, Jay-Gerin JP, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett*. 2012 Dec 31;327(1-2):48-60. doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.012. Epub 2011 Dec 17. PMID: 22182453; PMCID: PMC3980444.

Baudelet M, Van den Steen L, Tomassen P, Bonte K, Deron P, Huvenne W, et al. Very late xerostomia, dysphagia, and neck fibrosis after head and neck radiotherapy. *Head Neck*. 2019 Oct;41(10):3594-603. doi: 10.1002/hed.25880. Epub 2019 Jul 22. PMID: 31329343.

Beech N, Robinson S, Porceddu S, Batstone M. Dental management of patients irradiated for head and neck cancer. *Aust Dent J*. 2014 Mar;59(1):20-8. doi: 10.1111/adj.12134. Epub 2014 Feb 4. PMID: 24495127.

Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008 May 15;473(2):139-46. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.018. Epub 2008 Mar 25. PMID: 18395508; PMCID: PMC2413418.

Buss PM, Pellegrini Filho A. A saúde e seus determinantes sociais. *Physis*. 2007; 17(1): 77-93. doi: 10.1590/S0103-73312007000100006

Carneiro E, Parolin AB, Wichnieski C, Rosa EAR, Silva Neto UX, Westphalen VPD, et al. Expression levels of the receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin and the number of gram-negative bacteria in symptomatic and asymptomatic periapical lesions. *Arch Oral Biol*. 2017 Jan;73:166-71. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.10.004. Epub 2016 Oct 15. PMID: 27771584.

Castagnola R, Minciocchi I, Rupe C, Marigo L, Grande NM, Contaldo M, et al. (2020) The outcome of primary root canal treatment in postirradiated patients: A case series. *J Endod*. 2020 Apr;46(4):551-6. doi: 10.1016/j.joen.2019.12.005. Epub 2020 Feb 20. PMID: 32088010.

Chronopoulos A, Zarra T, Ehrenfeld M, Otto S. Osteoradionecrosis of the jaws: definition, epidemiology, staging and clinical and radiological findings. A concise review. *Int Dent J*. 2018;68(1):22-30. doi:10.1111/idj.12318

Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, de Lima VM, et al. Apical periodontitis and periodontal disease increase serum IL-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. *Clin Oral Investig*. 2014 Dec;18(9):2123-8. doi: 10.1007/s00784-014-1192-7. Epub 2014 Jan 25. PMID: 24464218.

Cintra LTA, Gomes MS, da Silva CC, Faria FD, Benetti F, Cosme-Silva L, et al. Evolution of endodontic medicine: a critical narrative review of the interrelationship between endodontics and systemic pathological conditions. *Odontology*. 2021 Oct;109(4):741-69. doi: 10.1007/s10266-021-00636-x. Epub 2021 Jul 8. PMID: 34240297.

Conway DI, Brenner DR, Mc Mahon AD, Macpherson LM, Agudo A, Ahrens W, et al. Estimating and explaining the effect of education and income on head and neck cancer risk: INHANCE Consortium pooled analysis of 31 case-control studies from 27 countries. *Int J Epidemiol*. 2015; 136(5): 1125-39.

Dash G, Mishra L, Singh NR, Behera R, Misra SR, Kumar M, et al. Prevalence and quality of endodontic treatment in patients with cardiovascular disease and associated risk factors. *J Clin Med*. 2022 Oct 13;11(20):6046. doi: 10.3390/jcm11206046. PMID: 36294367; PMCID: PMC9604757.

Daveshwar SR, Kapoor SV, Daveshwar MR. A clinical study determining pulp vitality in oropharyngeal cancer patients undergoing radiotherapy using diagnostic tool- pulse oximetry. *Curr Health Sci J*. 2021 Jan-Mar;47(1):5-9. doi: 10.12865/CHSJ.47.01.01. Epub 2021 Mar 31. PMID: 34211740; PMCID: PMC8200620

Dummer PM, Hicks R, Huws D. Clinical signs and symptoms in Pulp disease. *Int Endod J*. 1980 Jan;13(1):27-35. doi: 10.1111/j.1365-2591.1980.tb00834.x. PMID: 6935168.

Gadiwalla Y, Patel V. Osteonecrosis of the jaw unrelated to medication or radiotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018 May;125(5):446-453. doi: 10.1016/j.oooo.2017.12.016. Epub 2017 Dec 28. PMID: 29545079.

Gaetti-Jardim E, Jardim ECG, Schweitzer CM, da Silva JCL, Oliveira MM, Masocatto DC, et al. Supragingival and subgingival microbiota from patients with poor oral hygiene submitted to radiotherapy for head and neck cancer treatment. *Arch Oral Biol*. 2018; 90: 45-52. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.01.003. Epub 2018 Jan 8. PMID: 29533791.

Grégoire V, Lefebvre JL, Licitra L, Felip E; EHNS-ESMO-ESTRO guidelines working group. squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010 May;21 Suppl 5:v184-6. doi: 10.1093/annonc/mdq185. PMID: 20555077.

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. Epub 2018 Oct 10. PMID: 30339914.

Gupta S. Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules. *Exp Gerontol*. 2002; 37(2-3), 293-9. doi:10.1016/S0531-5565(01)00195-4

Gupta N, Pal M, Rawat S, Grewal MS, Garg H, Chauhan D, et al. Radiation-induced dental caries, prevention and treatment - A systematic review. *Natl J Maxillofac Surg*. 2015 Jul-Dec;6(2):160-6. doi: 10.4103/0975-5950.183870. PMID: 27390489; PMCID: PMC4922225.

Gupta N, Grewal MS, Gairola M, Grewal S, Ahlawat P. Dental pulp status of posterior teeth in patients with oral and oropharyngeal cancer treated with radiotherapy: 1- year follow-up. *J Endod*. 2018 Apr;44(4):549-54. doi: 10.1016/j.joen.2017.12.017. Epub 2018 Feb 13. PMID: 29452716.

Haapasalo M. Black-pigmented gram-negative anaerobes in endodontic infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1993 Mar;6(2-3):213-7. doi: 10.1111/j.1574-695X.1993.tb00329.x. PMID: 8518758.

Hair JM, Terzoudi GI, Hatzi VI, Lehockey KA, Srivastava D, Wang W, et al. BRCA1 role in the mitigation of radiotoxicity and chromosomal instability through repair of clustered DNA lesions. *Chem Biol Interact.* 2010 Nov 5;188(2):350-8. doi: 10.1016/j.cbi.2010.03.046. Epub 2010 Apr 4. PMID: 20371364.

Hassan SS, Attia MA, Attia AM, Nofal RA, Fathi A. Distribution of cytokeratin 17 in the parenchymal elements of rat's submandibular glands subjected to fractionated radiotherapy. *Eur J Dent.* 2020 Jul;14(3):440-447. doi: 10.1055/s-0040-1713705. Epub 2020 Jun 26. PMID: 32590870; PMCID: PMC7440947.

Hayman AR, Macary P, Lehner PJ, Cox TM. Tartrate-resistant acid phosphatase(Acp 5): identification in diverse human tissues and dendritic cells. *J Histochem Cytochem.* 2001 Jun;49(6):675-84. doi: 10.1177/002215540104900601. PMID: 11373314.

Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity.* 2008;41(3):218-23. doi: 10.1080/08916930701694667.

Hommez GM, De Meerleer GO, De Neve WJ, De Moor RJ. Clustering of oral symptoms versus radiation-induced apical periodontitis-author reply. *Clin Oral Investig.* 2013 Jan;17(1):339. doi: 10.1007/s00784-012-0895-x. Epub 2012 Dec 2. PMID: 23212126.

Hommez G, De Meerleer G, Vakaet L, De Neve W, Vermeersch H, De Moor R. Prevalence of apical periodontitis and associated coronal factors in head and neck irradiated patients. *Endod Pract Today.* 2008; 2 (2):105-16.

Hommez GM, De Meerleer GO, De Neve WJ, De Moor RJ. Effect of radiation dose on the prevalence of apical periodontitis--a dosimetric analysis. *Clin Oral Investig.* 2012 Dec;16(6):1543-7. doi: 10.1007/s00784-011-0665-1. Epub 2012 Jan 6. PMID: 22219024.

Huang YF, Liu SP, Muo CH, Tsai CH, Chang CT. The association between dental therapy timelines and osteoradionecrosis: a nationwide population-based cohort study. *Clin Oral Investig.* 2020 Jan;24(1):455-63. doi: 10.1007/s00784-019-02866-4. Epub 2019 May 20. PMID: 31111283.

Husch JFA, Stessuk T, den Breejen C, van den Boom M, Leeuwenburgh SCG, van den Beucken JJJP. A practical procedure for the in vitro generation of human osteoclasts and Their Characterization. *Tissue Eng Part C Methods.* 2021 Jul;27(7):421-432. doi: 10.1089/ten.TEC.2021.0122. PMID: 34162266.

Instituto Nacional do Câncer- INCA [internet]. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. INCA [cited 22 feb 2022]. Available from <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa?gt%3B=>.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva [internet]. Tipos de câncer. Rio de Janeiro. [cited 22 feb 2022]. Available from <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer>

International Agency for Research on Cancer – IARC [internet]. Lyon. Cancer Today. [Cited 1 jul. 2021]. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/featured-news/iarc-world-immunization-week/>

Jensen SB, Vissink A, Limesand KH, Reyland ME. Salivary gland hypofunction and xerostomia in head and neck radiation patients. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2019 Aug 1;2019(53):lgz016. doi: 10.1093/jncimonographs/lgz016. PMID: 31425600.

Jham BC, da Silva Freire AR. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006 Sep-Oct;72(5):704-8. doi: 10.1016/s1808-8694(15)31029-6. PMID: 17221065.

Jozefczuk J, Adjaye J. Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. *Methods Enzymol.* 2011;500:99-109. doi: 10.1016/B978-0-12-385118-5.00006-2. PMID: 21943894.

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 Sep;20:340-9. doi: 10.1016/0030-4220(65)90166-0. PMID: 14342926.

Kataoka SH, Setzer FC, Fregnani ER, Pessoa OF, Gondim E Jr, Caldeira CL. Effects of 3-dimensional conformal or intensity-modulated radiotherapy on dental pulp sensitivity during and after the treatment of oral or oropharyngeal malignancies. *J Endod.* 2012 Feb;38(2):148-52. doi: 10.1016/j.joen.2011.09.022.

Kataoka SH, Setzer FC, Gondim-Junior E, Fregnani ER, Moraes CJ, Pessoa OF, et al. Late effects of head and neck radiotherapy on pulp vitality assessed by pulse oximetry. *J Endod.* 2016 Jun;42(6):886-9. doi: 10.1016/j.joen.2016.02.016. PMID: 27071975.

Kataoka SH, Setzer FC, Gondim-Junior E, Pessoa OF, Gavini G, Caldeira CL. Pulp vitality in patients with intraoral and oropharyngeal malignant tumors undergoing radiation therapy assessed by pulse oximetry. *J Endod.* 2011 Sep;37(9):1197-200. doi: 10.1016/j.joen.2011.05.038.

Kaunitz JD, Yamaguchi DT. TNAP, TrAP, ecto-purinergic signaling, and bone remodeling. *J Cell Biochem.* 2008 Oct 15;105(3):655-62. doi: 10.1002/jcb.21885. PMID: 18773425.

Keene HJ, Daly T, Brown LR, Dreizen S, Drane JB, Horton IM, et al. Dental caries and *Streptococcus mutans* prevalence in cancer patients with irradiation-induced xerostomia: 1-13 years after radiotherapy. *Caries Res.* 1981;15(5):416-27. doi: 10.1159/000260547. PMID: 6942926.

Kfour SA, Eluf Neto J, Koifman S, Curado MP, Menezes A, Daudt AW, et al. Fraction of head and neck cancer attributable to tobacco and alcohol in cities of three Brazilian regions. *Rev Bras Epidemiol*. 2018;21:e180005. English, Portuguese. doi: 10.1590/1980-549720180005. Epub 2018 Aug 2. PMID: 30088590.

Khan FM, Gibbons JP. *The physics of radiation therapy*. Minneapolis: Wolters kluwer health. 2014. 624 p

Khojastepour L, Bronoosh P, Zeinalzade M. Mandibular bone changes induced by head and neck radiotherapy. *Indian J Dent Res*. 2012;23:774-777.

Khoury RD, Prado RFD, Matos FS, Meireles BR, Cardoso FGDR, Oliveira LD, et al. The influence of adrenergic blockade in rats with apical periodontitis under chronic stress conditions. *Arch Oral Biol*. 2020 Feb;110:104590. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104590. PMID: 31743801.

Kielbassa AM, Attin T, Schaller HG, Hellwig E. Endodontic therapy in a postirradiated child: review of the literature and report of a case. *Quintessence Int*. 1995 Jun;26(6):405-11. PMID: 8602421.

Kim JH, Jung MH, Kim JP, Kim HJ, Jung JH, Hahm JR, et al. Alpha lipoic acid attenuates radiation-induced oral mucositis in rats. *Oncotarget*. 2017 Aug 16;8(42):72739-72747. doi: 10.18632/oncotarget.20286. PMID: 29069822; PMCID: PMC564116

Lee IJ, Koom WS, Lee CG, Kim YB, Yoo SW, Keum KC, et al. Risk factors and dose-effect relationship for mandibular osteoradionecrosis in oral and oropharyngeal cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Nov 15;75(4):1084-91. doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.12.052. Epub 2009 Mar 26. PMID: 19327914.

Lee SC, Wang TJ, Chu PY. Predictors of weight loss during and after radiotherapy in patients with head and neck cancer: A longitudinal study. *Eur J Oncol Nurs*. 2019 Apr;39:98-104. doi: 10.1016/j.ejon.2019.02.004. Epub 2019 Feb 20. PMID: 30850144.

Leonardi Dutra K, Haas L, Porporatti AL, Flores-Mir C, Nascimento Santos J, Mezzomo LA, et al. Diagnostic accuracy of cone-beam computed tomography and conventional radiography on apical periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *J Endod*. 2016 Mar;42(3):356-64. doi: 10.1016/j.joen.2015.12.015. PMID: 26902914.

Lilly JP, Cox D, Arcuri M, Krell KV. An evaluation of root canal treatment in patients who have received irradiation to the mandible and maxilla. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998 Aug;86(2):224-6. doi: 10.1016/s1079-2104(98)90129-9. PMID: 9720099.

Lo Giudice R, Nicita F, Puleio F, Alibrandi A, Cervino G, Lizio AS, et al. Accuracy of periapical radiography and cbct in endodontic evaluation. *Int J Dent*. 2018 Oct 16;2018:2514243. doi: 10.1155/2018/2514243. PMID: 30410540; PMCID: PMC6206562.

Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*. 2000 Feb;127(2):117-26. doi: 10.1067/msy.2000.101584. PMID: 10686974.

Lotan A, Lifschytz T, Wolf G, Keller S, Ben-Ari H, Tatarsky P, et al. Differential effects of chronic stress in young-adult and old female mice: cognitive-behavioral manifestations and neurobiological correlates. *Mol Psychiatry*. 2018 Jun;23(6):1432- 1445. doi: 10.1038/mp.2017.237. Epub 2017 Dec 19. PMID: 29257131.

Machado FP, Khoury RD, Toia CC, Flores Orozco EI, de Oliveira FE, de Oliveira LD, et al. Primary versus post-treatment apical periodontitis: microbial composition, lipopolysaccharides and lipoteichoic acid levels, signs and symptoms. *Clin Oral Investig*. 2020 Sep;24(9):3169-3179. doi: 10.1007/s00784-019-03191-6. Epub 2020 Jan 13. PMID: 31933111.

Markitziu A, Heling I. Endodontic treatment of patients who have undergone irradiation of the head and neck. A longitudinal follow-up of eleven endodontically treated teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1981 Sep;52(3):294-8. doi: 10.1016/0030- 4220(81)90269- 3. PMID: 6945540.

Mattos VD, Ferman S, Magalhães DM, Antunes HS, Lourenço SQ. Dental and craniofacial alterations in long-term survivors of childhood head and neck rhabdomyosarcoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2019;127:272- 281. doi: 10.1016/j.oooo.2018.12.012. Epub 2018 Dec 21. PMID: 30685390.

Medrado L. *Carcinogênese: Desenvolvimento, diagnóstico e tratamento das neoplasias*. São Paulo: Érica; 2014. 144 p. ISBN-10: 8536511923

Mendes EM, Irie MS, Rabelo GD, Borges JS, Dechichi P, Diniz RS, et al. Effects of ionizing radiation on woven bone: influence on the osteocyte lacunar network, collagen maturation, and microarchitecture. *Clin Oral Investig*. 2020 Aug;24(8):2763-2771. doi: 10.1007/s00784-019-03138-x. Epub 2019 Nov 16. PMID: 31732880.

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 Aug;54(8):1342-52. doi: 10.1111/iej.13515. Epub 2021 Apr 8. PMID: 33724486

Montgomery S. Endodontic complications in an irradiated patient. *J Endod*. 1977 Jul;3(7):277-9. doi: 10.1016/S0099-2399(77)80048-4. PMID: 269222.

Müller VJ, Belibasakis GN, Bosshard PP, Wiedemeier DB, Bichsel D, Rücker M, et al. Change of saliva composition with radiotherapy. *Arch Oral Biol*. 2019 Oct;106:104480. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104480. Epub 2019 Jul 10. PMID: 31325717.

Munhoz L, Nishimura DA, Iida CH, Watanabe PCA, Arita ES. Head and neck radiotherapy-induced changes in dentomaxillofacial structures detected on panoramic radiographs: A systematic review. *Imaging Sci Dent*. 2021 Sep;51(3):223-35. doi: 10.5624/isd.20210011. Epub 2021 May 6. PMID: 34621649; PMCID: PMC8479433

Nagendrababu V, Segura-Egea JJ, Fouad AF, Pulikkotil SJ, Dummer PMH. Association between diabetes and the outcome of root canal treatment in adults: an umbrella review. *Int Endod J*. 2020 Apr;53(4):455-66. doi: 10.1111/iej.13253. Epub 2019 Dec 19. PMID: 31721243.

Nguyen MT, Götz F. Lipoproteins of gram-positive bacteria: key players in the immune response and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016 Aug 10;80(3):891-903. doi: 10.1128/MMBR.00028-16. PMID: 27512100; PMCID: PMC4981669.

Niazi SA, Bakhsh A. Association between endodontic infection, its treatment and systemic health: a narrative review. *Medicina (Kaunas)*. 2022 Jul 14;58(7):931. doi: 10.3390/medicina58070931. PMID: 35888650; PMCID: PMC9319780.

Ottosson S, Zackrisson B, Kjellén E, Nilsson P, Laurell G. Weight loss in patients with head and neck cancer during and after conventional and accelerated radiotherapy. *Acta Oncol*. 2013 May;52(4):711-8. doi: 10.3109/0284186X.2012.731524. Epub 2012 Oct 29. PMID: 23106176; PMCID: PMC3622234.

Özer MA, Polat N, Özen S, Parlakpınar H, Ekici K, Polat A, et al. Effects of molsidomine on retinopathy and oxidative stress induced by radiotherapy in rat eyes. *Curr Eye Res*. 2017 May;42(5):803-809. doi: 10.1080/02713683.2016.1238943. Epub 2016 Nov 29. PMID: 27897

Özgür A, Terzi S, Özdemir D, Tümkaya L, Rakıcı S, Mercantepe T, et al. Protective effect of whortleberry extract on salivary gland damage induced by neck irradiation in rats. *Ear Nose Throat J*. 2019 Jul;98(6):E64-E69. doi: 10.1177/0145561319846868. Epub 2019 Apr 28. PMID: 31032661.

Patel S, Brown J, Pimentel T, Kelly RD, Abella F, Durack C. Cone beam computed tomography in Endodontics - a review of the literature. *Int Endod J*. 2019 Aug;52(8):1138-52. doi: 10.1111/iej.13115. Epub 2019 Apr 9. PMID: 30868610.

Pierantoni CG, Dal Poz MR, França T. O Trabalho em saúde: abordagens quantitativas e qualitativas. Rio de Janeiro: CEPESC-IMS/UERJ. 2011. 326p.

Pinto KP, Ferreira CM, Maia LC, Sassone LM, Fidalgo TKS, Silva EJNL. Does tobacco smoking predispose to apical periodontitis and endodontic treatment need? A systematic review and meta-analysis. *Int Endod J*. 2020 Aug;53(8):1068-1083. doi: 10.1111/iej.13316. PMID: 32344459.

Pitkänen MA, Hopewell JW. Functional changes in the vascularity of the irradiated rat femur. Implications for late effects. *Acta Radiol Oncol*. 1983;22(3):253-6. doi: 10.3109/02841868309134038. PMID: 6312765.

Pytel A, Zielińska A, Staś J, Chabowski M. Quality of life, psychological distress, and nutritional status of polish patients with head and neck cancer treated with radiotherapy. *J Clin Med*. 2023 Jan 13;12(2):659. doi: 10.3390/jcm12020659. PMID: 36675586; PMCID: PMC9862327.

Ray-Chaudhuri A, Shah K, Porter RJ. The oral management of patients who have received radiotherapy to the head and neck region. *Br Dent J*. 2013 Apr;214(8):387- 93. doi: 10.1038/sj.bdj.2013.380. PMID: 23619856.

Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Kareva IG, Naf D, Nowsheen S, et al. Tumors induce complex DNA damage in distant proliferative tissues in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Oct 19;107(42):17992-7. doi: 10.1073/pnas.1008260107. Epub 2010 Sep 20. PMID: 20855610; PMCID: PMC2964229.

Ribeiro AC, Lopes MA, Brandão TB, Santos-Silva AR. Clustering of oral symptoms versus radiation-induced apical periodontitis. *Clin Oral Investig*. 2013 Jan;17(1):337. doi: 10.1007/s00784-012-0896-9. Epub 2012 Dec 2. PMID: 23212127.

Riches DW, Chan ED, Winston BW. TNF-alpha-induced regulation and signalling in macrophages. *Immunobiology*. 1996 Oct;195(4-5):477-90. doi: 10.1016/s0171-2985(96)80017-9. PMID: 8933152.

Sakko M, Tjäderhane L, Rautemaa-Richardson R. Microbiology of root canal infections. *Prim Dent J*. 2016 May 1;5(2):84-9. doi: 10.1308/205016816819304231. PMID: 28826437.

Sciubba JJ, Goldenberg D. Oral complications of radiotherapy. *Lancet Oncol*. 2006 Feb;7(2):175-83. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70580-0. PMID: 16455482.

Sharp J, Mulcare H, Schofield P. Trajectories of distress in women with gynaecological cancer treated with curative-intent radiotherapy. *Psychol Health*. 2023Jan 11:1-19. doi: 10.1080/08870446.2022.2162555. Epub ahead of print. PMID: 36628613.

Shenoy VK, Shenoy KK, Shetty P. Management of oral health in patients irradiated for head and neck cancer: A review. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)* 2007;5(1):117- 20.

Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat Res*. 2010 Apr-Jun;704(1-3):152-9. doi: 10.1016/j.mrrev.2009.12.005. Epub 2010 Jan 8. PMID: 20060490; PMCID: PMC3074954.

Seto BG, Beumer J 3rd, Kagawa T, Klokkevold P, Wolinsky L. Analysis of endodontic therapy in patients irradiated for head and neck cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1985 Nov;60(5):540-5. doi: 10.1016/0030-4220(85)90245-2. PMID: 3864116.

Singh A, Rosen EB, Randazzo JD, Estilo CL, Gelblum DY, Huryn JM. Intraoral radiation stents-Primer for clinical use in head and neck cancer therapy. *Head Neck*. 2021 Dec;43(12):4010-17. doi: 10.1002/hed.26848. Epub 2021 Sep 4. PMID: 34480818; PMCID: PMC8595620.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. *Int Endod J*. 2022 May;55 Suppl 3:512-530. doi: 10.1111/iej.13677. Epub 2022 Jan 13. PMID: 34958494.

Siqueira JF Jr. Strategies to treat infected root canals. *J Calif Dent Assoc*. 2001 Dec;29(12):825-37. PMID: 11813396.

Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod*. 1990 Oct;16(10):498-504. doi: 10.1016/S0099-2399(07)80180-4. PMID: 2084204.

Song W, Guo Y, Jiang S, Wei L, Liu Z, Wang X et al. Antidepressant effects of the ginsenoside metabolite compound k, assessed by behavioral despair test and chronic unpredictable mild stress model. *Neurochem Res*. 2018 Jul;43(7):1371-82. doi: 10.1007/s11064-018-2552-5. Epub 2018 May 22. PMID: 29790069.

Sønstevoid T, Johannessen AC, Stühr L. A rat model of radiation injury in the mandibular area. *Radiat Oncol*. 2015 Jun 9;10:129. doi: 10.1186/s13014-015-0432-6. PMID: 26050968; PMCID: PMC4464243.

Spitz DR, Azzam EI, Li JJ, Gius D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev*. 2004. Aug-Dec;23(3-4):311-22. PMID: 15197331.

Sroussi HY, Epstein JB, Bensadoun RJ, Saunders DP, Lalla RV, Migliorati CA, et al. Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis. *Cancer Med*. 2017 Dec;6(12):2918-31. doi: 10.1002/cam4.1221.. PMID: 29071801; PMCID: PMC5727249.

Strojan P, Hutcheson KA, Eisbruch A, Beitler JJ, Langendijk JA, Lee AWM, et al. Treatment of late sequelae after radiotherapy for head and neck cancer. *Cancer Treat Rev*. 2017 Sep;59:79-92. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.07.003. Epub 2017 Jul 18. PMID: 28759822; PMCID: PMC5902026.

Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994 Oct;78(4):522-30. doi: 10.1016/0030-4220(94)90047-7. PMID: 7800383.

Sweeney-Ambros AR, Biggs AE, Zimmerman ND, Mann KA, Damron TA, Oest ME. Orchestrated delivery of PTH [1-34] followed by zoledronic acid prevents radiotherapy-induced bone loss but does not abrogate marrow damage. *J Orthop Res*. 2022 Dec;40(12):2843-2855. doi: 10.1002/jor.25317. Epub 2022 Mar 25. PMID: 35266584; PMCID: PMC9463412.

Tacani PM, Figueira P, Marx A, Paim N. Manual de Condutas e Práticas de Fisioterapia em Oncologia: Neoplasias de Cabeça e Pescoço. São Paulo: Manole. 2017. ISBN Nº 852045348

Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(3):199-212. doi: 10.1177/154411130301400305. PMID: 12799323.

Wagner EM. Monitoring gene expression: quantitative real-time rt-PCR. *Methods Mol Biol.* 2013;1027:19-45. doi: 10.1007/978-1-60327-369-5_2. PMID: 23912981.

Xu M, Fan Q, Zhang J, Chen Y, Xu R, Chen L, et al. NFAT3/c4-mediated excitotoxicity in hippocampal apoptosis during radiation-induced brain injury. *J Radiat Res.* 2017 Nov 1;58(6):827-833. doi: 10.1093/jrr/rrx041. PMID: 28992110; PMCID: PMC5710526.

Yamasaki MC, Roque-Torres GD, Peroni LV, Nascimento EHL, Salmon B, Oliveira ML, et al. A modified protocol of mandibular osteoradionecrosis induction in rats with external beam radiation therapy. *Clin Oral Investig.* 2020 Apr;24(4):1561-1567. doi: 10.1007/s00784-019-03054-0. Epub 2019 Aug 10. PMID: 31401733.

Yamasaki MC, Roque-Torres GD, Peroni LV, Nascimento EHL, Salmon B, Oliveira ML, et al. Does the administration of meloxicam before head and neck radiotherapy reduce the risk of mandibular osteoradionecrosis? An animal model study. *Clin Oral Investig.* 2021 Jun;25(6):3739-45. doi: 10.1007/s00784-020-03701-x. Epub 2021 Jan 2. PMID: 33387032.

Yasuda H. Discovery of the RANKL/RANK/OPG system. *J Bone Miner Metab.* 2021 Jan;39(1):2-11. doi: 10.1007/s00774-020-01175-1. Epub 2021 Jan 3. Erratum in: *J Bone Miner Metab.* 2021 Jan 13;: PMID: 33389131.

Zhang MM, Liang YH, Gao XJ. Comparison of periapical radiography and cone-beam computed tomography in endodontic treated teeth for assessment of periapical lesions. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2016 Jun 18;48(3):539-43. Chinese. PMID: 27318921.

Zhong L, Yao L, Holdreith N, Yu W, Gui T, Miao Z, et al. Transient expansion and myofibroblast conversion of adipogenic lineage precursors mediate bone marrow repair after radiation. *JCI Insight.* 2022 Apr 8;7(7):e150323. doi: 10.1172/jci.insight.150323. PMID: 35393948; PMCID: PMC9057603.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa na utilização de animais.



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



Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP



CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo registrado sob o nº 04/2020, intitulado: **PERIODONTITE APICAL: AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO E REPARO EM RATOS SUBMETIDOS À RADIOTERAPIA DE CABEÇA E PESCOÇO.** sob a responsabilidade de MARCIA CARNEIRO VALERA GARAKIS, tendo como colaboradores: Carolina Fedel Gagliardi, Gustavo Guerrero Guimarães, Giovana Bignoto Minhoto, Itza Amaris Ribeiro Pinto, Rebeka Bahia Rodrigues e José Wilson Silva Mendes, 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 06/07/2020 e alterado na Reunião de 13/12/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	06/07/2020 a 31/04/2023
Espécie/linhagem/raça	Ratos Heterogênico Wistar
Nº de Animais	60 ratos + inclusão de 60 , total 120 (cento e vinte)
Peso/Idade	60 dias /300 grs.
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP
Alteração	Inclusão de novos colaboradores: Carolina Fedel Gagliardi, Gustavo Guerrero Guimarães, Giovana Bignoto Minhoto, Itza Amaris Ribeiro Pinto, Rebeka Bahia Rodrigues e José Wilson Silva Mendes
Compromisso/Relatório(s)	Parcial: 13/12/2021 a 31/07/2022 -Envio para a CEUA: 31/08/2022 Final: 01/08/2022 a 31/04/2023 -Envio para a CEUA: 30/05/2023

São José dos Campos, 13 de dezembro de 2021

Prof. Dra. ANDREA CARVALHO DE MARCO
Coordenadora